

# ANNALES

DE

# L'INSTITUT PASTEUR

---

**FÉLIX LESTOQUARD**

(1897-1940)

---

Né à Toulouse le 12 mars 1897, Lestoquard sortit en 1922 diplômé et lauréat de l'Ecole vétérinaire de sa ville natale. Il fut alors appelé à l'Institut Pasteur d'Algérie et adjoint à M. Donatien pour assurer la marche des services vétérinaires de notre filiale algérienne. Il entreprend tout de suite l'étude des piroplasmoses du mouton et décrit successivement deux espèces nouvelles : *Anaplasma ovis* et *Piroplasma ovis*. Puis, dans un travail d'ensemble dont il fait sa thèse de Doctorat vétérinaire et qui lui vaut une médaille d'argent de la Faculté de Médecine de Toulouse, il montre que 5 piroplasmes différents peuvent être rencontrés chez le mouton et la chèvre, et qu'ils sont strictement spécifiques pour les espèces ovine et caprine. Il appartient au groupe de chercheurs qui, dans une série de remarquables travaux poursuivis à l'Institut Pasteur

d'Algérie, ont élucidé la biologie des piroplasmes et créé une méthode de prémunition qui a fait ses preuves.

La collaboration de Lestoquard avec A. Donatien fut des plus fructueuses : après avoir surmonté mille difficultés, nos deux collègues obtiennent un sérum préventif efficace contre la peste porcine et indiquent la possibilité de conférer l'immunité active par la séro-inoculation ; ils établissent le diagnostic de cette même maladie par l'intradermo-réaction et découvrent chez le mouton une anémie infectieuse analogue à celle du cheval. Etudiant la Leishmaniose canine viscérale, ils s'aperçoivent qu'il s'agit d'une infection générale et que, même en l'absence de tout signe de maladie, on rencontre les parasites dans le derme cutané. Une méthode de diagnostic précise et facile est la conséquence de ces constatations. L'isolement d'un certain nombre de souches de clavelée leur permet de suivre les variations d'activité des virus isolés, et ils appliquent au contrôle de l'immunité du mouton à l'égard de cette maladie, le procédé d'intradermo-réaction imaginé par Durand et Conseil pour le contrôle de l'immunité contre la variole. Ils découvrent dans les hématies du mouton et du bœuf algériens deux parasites d'un genre nouveau pour lequel ils proposent le nom d'*Erythrocytozoon*. Ils réalisent, d'autre part, la transmission par les tiques de l'*Eperythrozoon* des bovins. Dans ces dernières années, ils ont fait connaître plusieurs types de *Rickettsia* : *R. canis*, *R. ovina*, *R. bovis*. Enfin, tout récemment, ils décrivaient une nouvelle maladie du porc qu'ils ont dénommée « Typhus du porc ».

Travailleur acharné, chercheur enthousiaste, Lestoquard paraissait avoir devant lui un long et bel avenir. La maladie l'a terrassé en quelques mois : le 30 octobre dernier, il succombait âgé seulement de quarante-trois ans.

Tous ses collègues de Paris s'associent au deuil qui frappe l'Institut Pasteur d'Algérie et ils expriment à M<sup>me</sup> Lestoquard et à ses enfants leurs regrets et leur profonde sympathie.

J. BRIDRÉ.



# LIMITES DE CONCENTRATION EN IONS H ET OH COMPATIBLES AVEC LE DÉVELOPPEMENT *IN VITRO* DU FLAGELLÉ *POLYTOMELLA CÆCA*

par ANDRÉ LWOFF.

(Institut Pasteur, Service de Physiologie microbienne.)

Le flagellé *Polytomella cæca* Pringsheim (Phytomonadine, Polyblépharidée) est capable de se développer dans un milieu simple renfermant, outre les aliments minéraux, un sel d'ammonium comme unique aliment azoté, un aliment carboné convenablement choisi — acide acétique, éthanol — et deux facteurs de croissance, la pyrimidine et le thiazol (A. Lwoff et H. Dusi, 1937-1938). D'après Pringsheim (1933), la concentration ionique convenant à ce flagellé correspond à des pH compris entre 5,3 et 6,5 : *Polytomella* aurait besoin d'une réaction acide. Cependant nous avons pu voir que le flagellé en question se développe bien à pH 4,5 et à pH 8,4 et avons indiqué comme limites les chiffres de 3,5 et de 9,0 (1933), résultats confirmés par L. Provasoli (1938). Entre temps, Pringsheim (1937) semblait abandonner ses premières conclusions relatives à la multiplication exclusive entre pH 5,3 et pH 6,5 et se rallier à nos constatations.

Au cours d'un travail sur l'action antagoniste de l'acide para-aminobenzoïque à l'égard du sulfamide (1462 F), nous avons été conduit à examiner l'activité antisulfamide en fonction du pH du milieu, ce qui nous a amené à constater que les limites des valeurs données par nous étaient trop étroites; on peut obtenir en effet la multiplication de *Polytomella cæca* entre pH 4,7 et pH 9,2, les limites compatibles avec la survie étant 4,4 et 9,6.

SOUCHE. — La souche utilisée est celle que nous avons isolée en 1933 par lavage d'un seul flagellé et qui a été étudiée par Lwoff et Dusi et par Provasoli.

MESURE DU pH. — Toutes les mesures de pH ont été effectuées avec le potentiomètre de Coleman à électrode de verre.

MILIEUX DE CULTURE. — Plusieurs milieux ont été utilisés dont nous donnons les formules.

*Milieu 1 :*

Asparagine purifiée. . . . .	2 grammes.
Acétate de sodium . . . . .	2 grammes.
Sulfate de magnésium . . . . .	0 gr. 1
Chlorure de sodium . . . . .	0 gr. 1
Phosphate monopotassique . . . . .	0 gr. 5
Aneurine. . . . .	0 milligr. 3
Eau bidistillée (dans un appareil en verre Pyrex). . . . .	1.000 cent. cubes.

Le pH de ce milieu est voisin de 6,0. Il est amené à la valeur voulue par addition, suivant le cas, de soude ou bien d'acide sulfurique, chlorhydrique ou acétique. Il est réparti à raison de 5 cent. cubes par tube dans des tubes en verre Pyrex de 16 millimètres de diamètre. La stérilisation, vingt minutes à 115°C, n'entraîne pas de changement de pH supérieur à 0,1 unité. Après stérilisation, on ajoute dans chacun des tubes 1 goutte de la solution suivante stérilisée à part (vingt minutes à 115°C) :

Citrate ferrique. . . . .	1 gramme.
Chlorure de calcium . . . . .	1 gramme.
Eau bidistillée . . . . .	1.000 cent. cubes.

Pour obtenir une solution parfaitement limpide, dissoudre à chaud le citrate de fer et ajouter ensuite le chlorure de calcium.

*Milieu 2 :* Même milieu que 1, où l'asparagine et l'acétate de sodium sont remplacés par l'acétate d'ammonium : 2 grammes pour 1.000 cent. cubes de milieu. Ce milieu 2, de pH naturel 6,1 environ, est ajusté au pH voulu par de la soude. Après stérilisation, les changements de pH sont les suivants :

6,1 . . . . .	5,85
7,3 . . . . .	6,45
7,9 . . . . .	6,9

*Milieu 3 :* Milieu 1 dans lequel l'acétate de sodium est rem-



placé par de l'éthanol à raison de 3 cent. cubes par litre. Le pH du milieu ajusté avec de la soude ne subit pas de changement notable au cours de la stérilisation pour des valeurs de pH voisines de 7,0. Les milieux alcalins, pH 9,0, subissent une légère acidification de 0,4 unité environ.

*Milieu 4* : Milieu 1 où l'asparagine est remplacée par le sulfate d'ammonium (2 grammes par litre) et l'acétate de sodium par l'éthanol (3 cent. cubes par litre). Ajusté à pH 7,0 avec de la soude, ce milieu subit après stérilisation une légère acidification de 0,5 unité environ. Acidifié par l'acide sulfurique à des pH voisins de 4,0 ou inférieurs, le milieu ne subit pas de changement de réaction.

D'autres variantes du milieu 1 ont été utilisées qui seront indiquées au cours du travail.

**ENSEMENCEMENTS.** — Les ensemencements sont pratiqués à raison de 1 goutte de culture pour 5 cent. cubes de milieu, sauf dans certains cas particuliers pour lesquels des précisions seront données. La culture-souche est une culture prélevée pendant la phase logarithmique de croissance ou à son voisinage immédiat. Elle renferme de 300 à 600 flagellés par millimètre cube. Dans ces conditions, la concentration initiale en flagellés dans les tubes ensemencés est de 3 à 6 flagellés par millimètre cube et l'on obtient à 22°, en quarante heures, dans un milieu favorable, une culture abondante renfermant de 1.000 à 2.000 *Polytomella* par millimètre cube.

#### CULTURE EN MILIEU FAIBLEMENT ACIDE, NEUTRE OU ALCALIN.

Le milieu 2, à l'acétate d'ammonium, s'alcalinise rapidement du fait du développement des flagellés. C'est ainsi qu'après deux jours de culture, le pH du milieu est passé de 5,85 à 7,55, après quarante heures de pH 6,7 à pH 7,38. Après huit jours, le pH oscille entre pH 8,15 et 8,20 pour des tubes de pH initial de 6,0 à 7,0. Cette alcalinisation est vraisemblablement due au fait que les flagellés utilisent plus d'acide acétique que d'ammoniaque. Dans le milieu ainsi alcalinisé, les flagellés ne paraissent pas supporter un pH supérieur à 8,2. Lorsque le pH critique est atteint, il ne reste plus que

de rares formes végétatives vivantes. Cependant, on verra que les flagellés peuvent supporter des milieux plus alcalins dans d'autres conditions.

ESSAI DE TAMPONNEMENT AVEC DES PHOSPHATES. — Pour tenter d'obtenir des cultures à pH constant, nous avons essayé de tamponner le milieu avec un mélange de phosphates monopotassique et disodique. Une solution M/2 de phosphate pH 6,9, préparée suivant Sørensen, a été stérilisée à l'autoclave et ajoutée ensuite au milieu 2 à l'acétate d'ammonium de pH 6,7, milieu qui renferme lui-même 0,5 p. 1.000 de phosphate monopotassique. A des concentrations M/200 à M/40, les phosphates exercent une action inhibitrice très marquée sur le développement des flagellés : retard de vingt-quatre à quarante-huit heures sur les tubes témoins. Cependant, la concentration de M/40 ne suffit pas à tamponner le milieu qui passe de pH 6,9 à pH 7,3 en deux jours et à pH 7,5 en cinq jours. Même après trois passages successifs en présence de phosphates M/40, les flagellés ensemencés dans le milieu tamponné avec une solution de phosphates M/40 présentent un développement retardé de vingt-quatre heures par rapport aux flagellés témoins, ensemencés dans le milieu non tamponné. Pourtant il est possible d'obtenir la multiplication en présence de phosphates M/28 ; le retard de la culture est alors de quelques jours. On peut donc parvenir à tamponner de façon relative le milieu à l'acétate d'ammonium (n° 2, p. 408) avec des phosphates, mais ceux-ci exercent, aux concentrations utiles, une action inhibitrice sur le développement.

Pour les expériences que nous désirions réaliser, nous avons besoin d'obtenir un développement rapide et régulier dans des milieux de pH sensiblement constant. Nous nous sommes donc adressé à d'autres formules.

Le milieu 3 à l'asparagine-éthanol (p. 408) est très favorable, mais il s'acidifie assez rapidement, passant de pH 7,0 à pH 6,6-6,3 en deux jours. Nous avons alors ajouté au milieu 3 des proportions variables du milieu 2 et avons constaté que lorsqu'on réalise un mélange de 100 parties de milieu à l'asparagine-éthanol (milieu 3) et de 30 parties de milieu à l'acétate d'ammonium (milieu 2), on obtient un milieu dont



le pH ne varie pas sensiblement pendant deux ou trois jours pour un pH initial voisin de 7,0.

Le pH du milieu 1, à l'asparagine-acétate de sodium, ne varie guère de plus de 0,2 unités pendant la première phase du développement, l'acidification produite par l'utilisation de l'asparagine étant pratiquement contrebalancée par l'alcalinisation entraînée par l'utilisation de l'acide acétique. Dans le milieu 1, les flagellés peuvent se développer normalement à pH 9,2. Cependant, la multiplication normale à pH 9,2 n'est pas obtenue d'emblée si l'on part d'une culture à pH 7,0. Dans ces conditions, un ensemencement large — VI gouttes de culture — est nécessaire si l'on veut éviter de trop longs délais de la multiplication. Pour obtenir rapidement une souche à pH 9,2, le mieux est, en partant de pH 7,0, d'effectuer un passage à pH 8,0 et un passage à pH 8,5.

Après un passage à pH 9,2, le développement à ce pH se produira sensiblement comme à pH 7,0. Les flagellés prélevés dans un milieu à pH 9,2 peuvent survivre dans des milieux plus alcalins ; la limite alcaline compatible avec la survie est voisine de pH 9,6. Des résultats analogues ont été obtenus avec le même milieu alcalinisé par du carbonate de sodium.

La question de savoir si le délai observé est dû à une adaptation ou à une sélection de flagellés préadaptés n'a pas été examinée.

#### CULTURE EN MILIEUX ACIDES.

MILIEU AU SULFATE D'AMMONIUM-ÉTHANOL. — Au cours d'expériences sur le métabolisme de *Polytomella caeca*, nous avons été amené à utiliser le milieu 4 au sulfate d'ammonium-éthanol. Les flagellés s'y multiplient parfaitement, bien que le milieu subisse une acidification rapide. Par exemple : pH initial 6,5, pH après dix-huit jours 2,6. Cette importante acidification est vraisemblablement due pour la plus grande part à la libération de l'acide sulfurique, conséquence de l'utilisation de l'ammonium. L'utilisation de l'acidification naturelle progressive semble être le moyen le plus simple pour obtenir l'« adaptation » des flagellés à des milieux très acides.

Nous avons alors tenté de définir la limite de la concentration en ions H compatible avec la multiplication. Le milieu 4,

au sulfate d'ammonium-éthanol (p. 409), acidifié par l'acide sulfurique jusqu'à pH 2,6, s'acidifie en une douzaine de jours du fait du développement des flagellés, jusqu'à pH 2,0. Mais à partir de cultures ainsi lentement acidifiées, ne renfermant pas plus d'une centaine de flagellés par millimètre cube à la partie supérieure du milieu, les repiquages dans des milieux de pH inférieurs à 2,0 ne sont suivis d'aucun développement. C'est à partir de cultures à pH 2,2, prélevées au voisinage de la phase logarithmique de croissance, que nous avons réussi à ensemençer fructueusement des tubes de milieu de pH 2,0 à 1,7. L'ensemencement doit être abondant, effectué avec VIII à X gouttes de cultures renfermant 800 flagellés par millimètre cube environ. La zone de pH comprise entre pH 2,0 et pH 1,7 constitue évidemment la zone critique. L'ensemencement n'est pas toujours suivi du développement de la culture, mais on peut cependant entretenir la souche de *Polytomella caeca* à pH 1,7 au cours de repiquages en série.

Dans cette zone critique, les flagellés sont sensibles aux températures élevées. C'est ainsi que si l'on enseme, à partir d'une culture à pH 2,3, des milieux de pH 2,6, 2,1 et 1,8 on constate un développement normal à 22° ; à 28°, par contre, développement normal à pH 2,6 seulement, survie de quarante-huit heures à pH 2,1 et ni culture ni survie à pH 1,8.

On peut obtenir aussi un développement plus régulier à pH 1,7 en ajoutant au milieu un peu de peptone, par exemple III gouttes d'une solution à 3 p. 100 pour 5 cent. cubes de milieu. La présence de peptone n'entraîne pas d'alcalinisation au cours du développement de la culture.

Dans les milieux au sulfate d'ammonium-éthanol de pH initial 2,0 à 1,7, le métabolisme des flagellés a pour conséquence, comme dans les milieux plus alcalins, une forte augmentation de la concentration en ions H. Cette augmentation, exprimée en pH ne se traduit bien entendu que par une faible diminution de celui-ci. C'est ainsi qu'un milieu de pH initial 1,7 est passé à pH 1,38 après trente jours. Il renfermait encore des flagellés vivants, mais il ne nous a pas été possible d'obtenir de développement en ensemençant les flagellés dans des milieux de pH inférieurs à 1,7.



MILIEU A L'ASPARAGINE-ACÉTATE DE SODIUM. — On pouvait se demander si les *Polytomella* ne parviendraient pas à se multiplier à des pH plus bas dans d'autres milieux.

Le milieu à l'asparagine-acétate de sodium de pH naturel 6,0 peut être acidifié sans inconvénient par l'acide acétique jusqu'à pH 5,0. Mais entre pH 4,0 et pH 5,0, le pouvoir tampon du mélange acide acétique-acétate de sodium est considérable et, pour obtenir une baisse de pH, il faut ajouter au milieu de l'acide acétique à une concentration telle que le milieu devient toxique. Nous avons alors, soit acidifié le milieu par l'acide sulfurique, soit remplacé l'acétate de sodium du milieu 1 par de l'acide acétique à la concentration de 2 à 0 c. c. 5 par litre, le pH étant ajusté par addition d'acide sulfurique. Comme dans les milieux au sulfate d'ammonium, les flagellés n'ont pu se multiplier que jusqu'à pH 4,7.

DISCUSSION. — Le flagellé *Polytomella cæca* est donc capable de vivre dans des milieux de pH compris entre 4,4 et 9,6. On peut entre ces limites très éloignées distinguer plusieurs zones :

1° Une zone alcaline critique, de pH 9,6 à pH 9,2, où les flagellés peuvent survivre.

2° Une zone alcaline normale de pH 9,2 à pH 8,0 où les flagellés peuvent se multiplier normalement après adaptation si la souche originelle est à pH 7,0.

3° Une zone de pH 8,0 à pH 4,5, où le développement se produit normalement à partir d'une souche à pH 7,0.

4° Une zone acide normale de pH 4,5 à pH 2,2 où le développement se produit normalement après adaptation.

5° Une zone acide critique de pH 2,2 à pH 1,7, où le développement n'a lieu qu'après ensemencement abondant de cultures adaptées.

6° Une zone acide de survie de pH 1,7 à pH 1,4, où l'ensemencement n'est pas suivi de culture, mais où les flagellés peuvent survivre à condition que l'acidification du milieu se soit produite lentement comme conséquence de leur métabolisme.

Il n'y a pas, assurément, de limites tranchées entre les diverses zones et le changement de comportement est progressif. Mais les 6 zones qui ont été définies correspondent,

dans l'ensemble, chacune à un comportement différent des flagellés. Il ne faut pas oublier que ces zones sont établies en considérant une souche à pH 7,0. Elles seraient quelque peu différentes si l'on considérait une souche à pH 3,0, le changement de pH 3,0 à pH 7,0 se faisant beaucoup plus facilement que le changement inverse. Enfin, il faut rappeler que le terme d'« adaptation » est utilisé ici dans son sens large ; il signifie que les flagellés deviennent capables de se développer dans un milieu donné sans préjuger de la nature intime du phénomène : sélection, changement lent des propriétés, etc.

COMPARAISON DE *Polytomella cæca*  
AVEC D'AUTRES MICROORGANISMES.

Rares sont les Protozoaires et les Protophytes reconnus capables de se multiplier dans des milieux très acides. Parmi les flagellés, le cas extrême connu semble être celui d'*Euglena gracilis* dont Dusi (1930) a obtenu la culture à pH 3,5 et Alexander (1934) à pH 3,0. Nous n'avons pas trouvé mention de Protozoaires ou de Protophytes susceptibles de se développer dans des milieux de pH inférieurs à 3,0.

Parmi les bactéries, une seule semble avoir été jusqu'ici cultivée dans des milieux de pH inférieurs à 2,0 : *Thiobacillus thiooxidans* qui supporte des concentrations d'acide sulfurique allant jusqu'à 0,5 M et se développe bien à pH 1,0 (Waksman et Starkey, 1922).

TABLEAU.

ORGANISMES	pH MINIMUM	pH MAXIMUM	AUTEURS
<i>Fusarium oxysporum</i> . . . .	1,8-2,0	9,2-11,1	Johnson.
<i>Fusarium bullatum</i> . . . .	2,0-2,2	9,2-11,2	Johnson.
<i>Penicillium italicum</i> . . . .	1,6-1,8	9,1-9,3	Johnson.
<i>Penicillium variable</i> . . . .	1,6-1,8	10,1-11,1	Johnson.
<i>Aspergillus terricola</i> . . . .	1,6-1,8	9,0-9,3	Johnson.
<i>Aspergillus orizæ</i> . . . . .	1,6-1,8	9,0-9,3	Johnson.
<i>Aspergillus niger</i> . . . . .	1,2	?	Terroine et Wurmser.
<i>Saccharomyces cerevisiæ</i> . .	1,85	?	Hjorth-Hansen.
<i>Thiobacillus thiooxidans</i> . .	1,0	9,8	Waksman et Starkey.
<i>Polytomella cæca</i> . . . . .	1,4-1,7	9,2-9,6	A. Lwoff.



Les moisissures, au contraire, sont connues comme aptes à croître dans des milieux très acides. La limite pour *Aspergillus terricola*, *Penicillium italicum* et *Fusarium oxysporum* est comprise entre 1,6 et 2,0 (Johnson, 1923). D'après Terroine et Wurmser (1922), le développement d'*Aspergillus niger* est normal jusqu'à pH 1,7, la limite étant au voisinage de 1,2. Entre pH 1,7 et pH 1,2, il se produit, disent Terroine et Wurmser, « un ralentissement considérable de la croissance et un changement notable du coefficient d'utilisation ».

Il semble que beaucoup de levures puissent se multiplier dans des milieux très acides. Hjorth-Hansen (1939) a obtenu le développement de *Saccharomyces cerevisiæ* à pH 1,85. On peut noter, d'après le tableau ci-contre, que la plupart des organismes capables de se développer dans des milieux de pH inférieurs à 2,0 sont également capables de développement dans des milieux de pH supérieurs à 9,0.

#### CONCLUSIONS.

1° Le flagellé *Polytomella cæca* peut vivre dans des milieux de pH compris entre 9,6 et 1,4.

2° La multiplication est normale entre pH 2,2 et pH 9,2, quoique pour des milieux de pH compris entre 2,2 et 4,5 et entre 8,0 et 9,2 un certain délai d'adaptation soit nécessaire aux flagellés ayant vécu habituellement à pH 7,0.

3° Le développement entre pH 2,2 et pH 1,7 ne peut être obtenu qu'après ensemencements larges.

4° *Polytomella cæca* s'ajoute à la liste des rares micro-organismes reconnus aptes à se développer dans des milieux de pH inférieurs à 2,0.

#### BIBLIOGRAPHIE

- ALEXANDER (G.). *Biol. Bull.*, **61**, 1931, p. 165.  
 DUSI (H.). *C. R. Soc. Biol.*, **103**, 1930, p. 1184.  
 HJORTH-HANSEN (S.). *Bioch. Zeitschr.*, **301**, 1939, p. 292.  
 JOHNSON (H. W.). *Iowa Agr. Exper. Stat. Res. Bull.*, **76**, 1923, cité d'après WAKSMANN (S. A.). *Principles of soil Microbiology*, The Williams and Wilkins Co, Baltimore, 1927.  
 LWOFF (A.). *C. R. Soc. Biol.*, **119**, 1935, p. 975.

- LWOFF (A.) et DUSI (H.). *C. R. Ac. Sc.*, **205**, 1937, p. 630 ; *C. R. Soc. Biol.*, **427**, 1938, p. 53 et 1408 ; **428**, 1938, p. 238.
- FRINGSHEIM (E. G.). *Die Naturwissenschaften*, **23**, 1935, p. 110.
- FRINGSHEIM (E. G.). *Arch. f. wissenschaft. Bot.*, **26**, 1937, p. 665.
- PROVASOLI (L.). *Boll. di Zool. Agr. e Bachicoltura*, **9**, 1938, p. 1.
- TERROINE (E.) et WURMSER (R.). *Bull. Soc. Chimie biol.*, **4**, 1922, p. 159.
- WAKSMAN (A. A.) et STARKEY (R. L.). *The Journ. Gen. Physiol.*, **5**, 1922, p. 286.



## LA NUTRITION CARBONÉE DE *MORAXELLA LWOFFI*

par ANDRÉ LWOFF et ALICE AUDUREAU.

(Institut Pasteur, Service de Physiologie microbienne.)

Parmi les espèces appartenant au genre *Moraxella* Lwoff, seule *Moraxella lwoffii* Audureau est susceptible de se développer dans un milieu synthétique simple, non additionné de facteurs de croissance. Un sel d'ammonium suffit à assurer la nutrition azotée ; l'éthanol, la nutrition carbonée (A. Audureau, 1940).

Nous apportons aujourd'hui les résultats de nos recherches sur l'utilisation de divers composés pour la nutrition carbonée de *Moraxella lwoffii*.

SOUCHE. — Nous avons utilisé *M. lwoffii* var. *brevis* (A. Audureau, 1940). Une seule souche (la souche T) a été étudiée complètement. Nous avons cependant vérifié qu'une autre souche (B) se comportait comme la première en présence des substances étudiées.

MILIEU. TECHNIQUES. — Le milieu de base est le suivant :

Sulfate d'ammoniaque. . . . .	0,75
Phosphate monopotassique . . . . .	4,5
Chlorure de potassium . . . . .	0,5
Sulfate de magnésium . . . . .	0,05
Eau bidistillée . . . . .	1.000
Soude pour pH 7,4.	

Après stérilisation, on ajoute pour 4 cent. cubes de milieu 1 goutte de la solution suivante, stérilisée à part :

Citrate ferrique : . . . . .	1 gramme.
Chlorure de calcium. . . . .	1 —
Eau bidistillée . . . . .	1.000 —

Au milieu ainsi constitué, on ajoute l'aliment carboné en





Acide aspartique (acide $\alpha$ -amino-succinique).	$\text{COOH} - \text{CH}_2 - \text{CH}(\text{NH}_2) - \text{COOH}$	0 (B)
Acide glutamique droit (acide $\alpha$ -amino-glutarique)	$\text{COOH} - \text{CH}_2 - \text{CH}_2 - \text{CH}(\text{NH}_2) - \text{COOH}$	0 (S)
Acétaldéhyde . . . . .	$\text{CH}_3 - \text{CHO}$	++ (X)
Méthylglyoxal . . . . .	$\text{CH}_3 - \text{CO} - \text{CHO}$	++
Acide glycolique . . . . .	$\text{CH}_2\text{OH} - \text{COOH}$	0
Acide pyruvique . . . . .	$\text{CH}_3 - \text{CO} - \text{COOH}$	++ (B)
Acide lactique . . . . .	$\text{CH}_3 - \text{CHOH} - \text{COOH}$	++ (B)
Acide oxalique . . . . .	$\text{COOH} - \text{COOH}$	0
Acide malonique . . . . .	$\text{COOH} - \text{CH}_2 - \text{COOH}$	0 (S)
Acide succinique . . . . .	$\text{COOH} - \text{CH}_2 - \text{CH}_2 - \text{COOH}$	++ (X)
Acide fumarique . . . . .	$\text{COOH} - \text{CH} = \text{CH} - \text{COOH}$	++ (X)
Acide (l) malique . . . . .	$\text{COOH} - \text{CH}_2 - \text{CHOH} - \text{COOH}$	++ (X)
Acides (d) et (l) tartriques . . . . .	$\text{COOH} - \text{CH}_2 - \text{CHOH} - \text{COOH}$	++ (X)
Acide glutarique . . . . .	$\text{COOH} - \text{CH}_2 - \text{CH}_2 - \text{CH}_2 - \text{COOH}$	0
Acide citrique . . . . .	$\text{COOH} - \text{CH}_2 - \text{C}(\text{OH})(\text{COOH}) - \text{CH}_2 - \text{COOH}$	++
Méthylamine . . . . .	$\text{CH}_3\text{NH}_2$	0
Diméthylamine . . . . .	$(\text{CH}_3)_2\text{NH}$	0
Ethylamine . . . . .	$\text{CH}_3 - \text{CH}_2\text{NH}_2$	+
Diéthylamine . . . . .	$(\text{CH}_3 - \text{CH}_2)_2\text{NH}$	0
Colamine (amino-éthanol) . . . . .	$\text{NH}_2 - \text{CH}_2 - \text{CH}_2\text{OH}$	0
Acétamide . . . . .	$\text{CH}_3 - \text{CONH}_2$	0 (B)
Arabinose . . . . .		0
Lévulose . . . . .		0
Galactose . . . . .		0
Glucose . . . . .		0
Mannite . . . . .		0
Lactose . . . . .		0
Saccharose . . . . .		0
Maltose . . . . .		0
Amidon . . . . .		0
Inuline . . . . .		0

+++ culture très abondante correspondant à 70 à 200 unités de l'échelle de l'électrophotomètre de Meunier. Les mesures sont faites dans une cuve de 10 millimètres d'épaisseur utile, avec une lumière filtrée de  $\lambda$  moyen efficace de 0  $\mu$  55 environ. 1 unité correspond à une variation de densité optique de 0,005. ++, culture moyenne : 20 à 70 unités. +, culture pauvre : 2 à 20 unités. (l) ou (t. l.), culture lente ou très lente. (X), le départ de la culture n'a lieu qu'après un délai de trois semaines environ à 37°. (S), résultats obtenus avec la souche normale et confirmés avec la souche apte à utiliser l'acide succinique. (B), une seconde souche (B) de *Moraxella lwoffii* s'est comportée comme la souche (T).

proportions convenables, soit par exemple I à V gouttes d'éthanol à 100° pour 4 cent. cubes. L'éthanol à concentration élevée se montre plus ou moins toxique. C'est ainsi qu'avec X gouttes d'éthanol pour 4 cent. cubes de milieu, le développement de la culture se trouve légèrement retardé. Il n'est d'ailleurs pas nécessaire de fournir à la bactérie une surabondance d'aliment carboné. On obtient une très bonne culture en ajoutant II gouttes d'éthanol dilué au 1/10 pour 4 cent. cubes de milieu et un développement encore appréciable avec II gouttes d'éthanol dilué au 1/100 (ce qui donne une concentration finale de 1 p. 5.000 environ). Pour l'entretien de la souche destinée aux expériences, nous avons utilisé un milieu additionné de I à II gouttes d'éthanol au 1/10 pour 4 cent. cubes. Dans ces conditions, l'ensemencement dans un milieu non additionné d'aliment carboné n'est suivi que d'un développement négligeable.

En présence de l'aliment carboné favorable, on obtient en général, en vingt-quatre heures, une culture abondante. Certains composés, comme par exemple l'acide propionique, se sont révélés toxiques à concentration élevée. L'absence de développement en présence d'une substance déterminée pouvant être due à la toxicité de cette substance, nous avons, pour tous les corps « négatifs », effectué une épreuve de non-toxicité : un tube témoin contenant de l'éthanol et la substance à étudier doit montrer un développement normal. Toutes les expériences ont été répétées plusieurs fois. Les tubes dans lesquels ne se produisait aucun développement ont été suivis pendant deux mois avant que l'on conclue à la non-assimilation d'une substance.

Les corps à étudier sont stérilisés, soit à l'autoclave vingt minutes à 115° pour les corps thermostables, soit par filtration sur bougie Chamberland L 3 pour les corps thermolabiles. Nous avons utilisé, soit des produits Merck pour analyses, soit des produits Fraenkel et Landau, soit des produits du Département de Biochimie de l'Université d'Illinois. Certains corps ont été purifiés à nouveau. Les résultats des expériences sont donnés dans les tableaux ci-contre (p. 418).



## DISCUSSION DES RÉSULTATS.

COMPORTEMENT DES BACTÉRIES. — On peut distinguer, parmi les aliments carbonés, du point de vue du comportement de *Moraxella lwoffii*, 4 catégories de substances :

- 1° celles qui ne permettent pas de développement ;
- 2° celles qui permettent une culture rapide plus ou moins abondante ;
- 3° celles qui ne permettent qu'une culture plus ou moins abondante, mais lente ou très lente ;
- 4° celles qui ne permettent une culture qu'après une période négative plus ou moins longue. Disons tout de suite que cette période de latence peut atteindre trois semaines ou plus à 37° pour les acides succinique, fumarique, malique et glutamique. Des expériences qui seront exposées de façon détaillée dans un mémoire qui paraîtra prochainement dans cette Revue nous ont montré les faits suivants :

a) 6 souches obtenues chacune à partir d'une seule bactérie isolée avec le micromanipulateur de de Fonbrune, se sont comportées comme la souche originelle ;

b) dans une culture âgée de huit jours (aliment carboné : éthanol), il y a environ une bactérie sur 200 millions capable d'utiliser l'acide succinique comme unique aliment carboné (expériences réalisées sur milieux solides et en milieux liquides). Si par exemple l'on ensemence 200 millions de bactéries dans 12 tubes d'un milieu renfermant de l'acide succinique comme unique aliment carboné, un seul tube montre une culture après quarante-huit heures. Dans les autres tubes, le développement n'a lieu qu'après un délai de trois semaines environ. Il y a eu développement en quarante-huit heures lorsqu'on a ensemencé une bactérie apte à utiliser l'acide succinique. Le délai de trois semaines est le délai nécessaire pour que le changement se produise, qui transforme l'une des bactéries inaptées à utiliser l'acide succinique (s —) en une bactérie apte à l'utiliser (s +). Ce changement est une mutation ;

c) la souche (s +) est apte à utiliser immédiatement les

acides fumarique et l-malique, alors que la souche (s —) ne se développe qu'après trois semaines environ en présence de ces substances.

**ALIMENTATION CARBONÉE.** — D'une façon générale, les alcools et les acides gras sont les aliments carbonés les plus favorables.

*Alcools.* — 1° Les mono-alcools primaires normaux, à nombre de groupements  $\text{CH}_2$  pairs ou impairs, sont assimilables.

2° Le méthanol à un seul atome de carbone n'est pas utilisé. Notons qu'il en est de même de la méthylamine, également à un seul atome de carbone.

3° L'isobutanol est assimilable après une période d'une huitaine de jours, alors que les alcools butyliques secondaires ou tertiaires ne le sont pas. Il est possible que le délai observé corresponde à l'apparition d'une mutation ; cette question n'a pas été examinée.

4° La formation d'une liaison éthylénique entraîne, dans certains cas, l'inactivation de l'alcool : le propanol est actif, l'alcool allylique inactif. Mais la présence d'une liaison éthylénique dans la molécule n'est pas forcément fatale : l'acide fumarique est utilisable.

5° Parmi les acides-alcools, l'acide glycolique est inutilisable, l'acide lactique très favorable, et parmi les diacides-alcools, l'acide tartrique est inutilisable.

*Acides gras.* — Les acides gras normaux sont utilisables depuis l'acide acétique jusqu'à l'acide nonylique. Les acides à plus de 9 atomes de carbone n'ont pas été étudiés. L'acide isovalérianique est également favorable.

*Acides cétoniques.* — L'acide pyruvique constitue pour *M. lwoffi*, comme pour beaucoup d'autres bactéries, un excellent aliment carboné.

*Aldéhydes.* — L'acétaldéhyde est utilisable ; le méthylglyoxal ne l'est pas.

*Dérivés divers des acides gras.* — Les acides  $\alpha$ - et  $\gamma$ -hydroxybutyriques ne peuvent pas servir d'aliment carboné. Ce résultat obtenu par l'ensemencement de la souche (s —) a

été confirmé par l'ensemencement de la souche (s +). L'acide  $\beta$ -hydroxybutyrique est utilisable. Pour ce qui concerne les dérivés aminés de l'acide butyrique, les acides  $\alpha$ - et  $\beta$ -aminobutyriques sont inutilisables, alors que le dérivé  $\gamma$ -aminobutyrique est actif.

*Acides aminés.* — Les acides aminés sont de mauvais aliments carbonés pour *Moraxella*. Parmi les acides étudiés, seuls l'alanine, l'acide  $\gamma$ -aminobutyrique et l'acide glutamique permettent des cultures, d'ailleurs peu abondantes. Ajoutons que le développement en présence d'acide glutamique ne se produit qu'après une période négative d'environ trois semaines, comme pour les acides succinique, fumarique et malique.

*Diacides.* — Les diacides 1-2 (oxalique) et 1-3 (malonique) sont inutilisables. Les acides succinique, fumarique, (l)-malique, ne sont pas utilisés par la souche normale, mais peuvent servir d'aliments carbonés après mutation. Cependant tous les diacides 1-4 ne sont pas utilisables : les acides (l) et (d) tartrique ne peuvent pas servir d'aliments carbonés. Ces deux acides, comme aussi l'acide malonique, ne sont pas utilisables non plus par la mutation (s +) assimilant l'acide succinique. Parmi les diacides 1-5, seul l'acide glutarique a été étudié. Il permet de bonnes cultures à 37° après, toutefois, une phase négative de un à trois jours. Il est possible que ce délai corresponde à l'apparition d'une mutation, question qui sera examinée ultérieurement.

*Glucides.* — Aucun des glucides étudiés ne peut servir d'aliment carboné pour *Moraxella lwoffii*.

En examinant l'ensemble des données relatives aux diverses substances, nous pouvons essayer de résumer les relations entre la structure des composés et la possibilité de leur utilisation par *M. lwoffii* pour sa nutrition carbonée. L'existence de mutations — très rares — capables d'assimiler les diacides 1-4 pose naturellement la question de l'apparition possible d'autres mutations susceptibles d'utiliser les substances classées ici comme inutilisables. L'existence hypothétique de ces mutations ne doit cependant pas empêcher de considérer comme acquises les données relatives à la nutrition carbonée « normale » de la bactérie étudiée.



Les relations entre la structure des composés et leur utilisation comme aliment carboné sont dégagées dans les conclusions de ce travail.

#### CONCLUSIONS.

1° Les substances à un seul atome de carbone (méthanol, méthylamine) sont inutilisables comme aliment carboné par *Moraxella lwoffii*.

2° Les structures  $\text{CH}_3\text{COOH}$  (acide acétique) et  $\text{CH}_3\text{CH}_2\text{OH}$  (éthanol) sont favorables. Les composés  $\alpha$ -hydroxy- (acide glycolique, éthylène glycol) et les composés  $\alpha$ -amino- (glycocolle, colamine), correspondant à l'acide acétique et à l'éthanol, sont inutilisables.

3° Les structures  $\text{CH}_3\text{CH}_2\text{COOH}$  (acide propionique) et  $\text{CH}_3\text{CH}_2\text{CH}_2\text{OH}$  (propanol) sont favorables. Les dérivés  $\alpha$ -hydroxy- (acide lactique, propylène glycol),  $\alpha$ -cétoniques (acide pyruvique) et  $\alpha$ -aminés (alanine), correspondant à l'acide propionique et au propanol, sont utilisables. Les dérivés  $\beta$ -hydroxy- (sérine),  $\beta$ -aminés ( $\beta$ -alanine) et  $\beta$ -sulfhydrylés (cystéine) sont inutilisables.

4° Les dérivés  $\alpha$ - et  $\beta$ -aminés des acides valérianique normal et isovalérianique (acides gras utilisables) et de l'acide succinique (diacide utilisable), c'est-à-dire les acides  $\beta$ -amino-valérianique,  $\alpha$ -amino-isovalérianique et aspartique, sont inutilisables.

5° Les diacides 1-4 (acides succinique, fumarique, l-malique) ne sont utilisables que par une mutation de la souche normale. Les acides (d) et (l) tartrique sont inutilisables.

6° L'acide glutamique n'est utilisable par la souche normale qu'après une longue période négative, qui correspond probablement au délai nécessaire à l'apparition d'une mutation.

7° Les glucides ne peuvent pas servir d'aliment carboné à *Moraxella lwoffii*.

#### BIBLIOGRAPHIE

- LWOFF (A.). Ces *Annales*, **62**, 1939, p. 168.  
AUDUREAU (A.). *Ibid.*, **64**, 1940, p. 126.

# LE LAPIN INOCULÉ PAR VOIE RESPIRATOIRE AVEC LES RICKETTSIES DU TYPHUS HISTORIQUE POUVOIR ANTIGÈNE DES SUSPENSIONS (1)

par PAUL DURAND et PAUL GIROUD.

(*Institut Pasteur.*)

La production de grandes quantités de rickettsies du typhus épidémique est un problème extrêmement intéressant, car elle est à la base même de tout essai important de vaccination. Elle ne peut être obtenue qu'en partant de cultures ou d'organes infectés servant comme antigène. Toutes les techniques de culture *in vitro* actuellement connues ou procédés dérivés de ceux de Nigg et Landsteiner, Zinsser, Cox, ne nous ont donné à ce point de vue que des résultats peu intéressants en considération du travail, du matériel et des précautions qu'elles nécessitent. Par contre, Ruiz Castaneda a obtenu la pullulation de rickettsies dans le poumon de divers animaux à partir de sa souche « orchitique » de typhus (2). Paul Durand et Hélène Sparrow, se servant de la souche historique Tunis Rabta, ont infecté de nombreux animaux par voie pulmonaire au départ du pou (3). Nous avons voulu pour cette souche étudier plus particulièrement le comportement du lapin.

La culture d'un virus typhique se localise d'autant mieux que l'animal est moins sensible à l'infection. Ce fait que

(1) Les expériences relatées dans ce mémoire ont été faites de novembre 1939 à avril 1940 et, pour des raisons indépendantes de notre volonté, n'ont pas été publiées jusqu'à présent. Cependant, F. Murgatroyd, dans une communication sur la vaccination contre les infections typhiques en tient compte et G. M. Findlay prenant part à la discussion note le résultat de nos essais sur le lapin. MURGATROYD (F.). *Trans. Roy. Soc. trop. Med. a. Hyg.*, **34**, n° 1, juin 1940.

(2) RUIZ CASTANEDA (M.). *Am. J. Path.*, **45**, n° 4, 1939, p. 467.

(3) DURAND (Paul) et SPARROW (Hélène). *C. R. Acad. Sc.*, **210**, 11 mars 1940, p. 420 ; *Arch. Inst. Pasteur Tunis*, **29**, mars 1940, p. 1.

nous avons mis en évidence avec le typhus murin, s'applique aussi au typhus historique. En effet, le cobaye, animal de choix pour l'entretien des souches, ne donne que de médiocres résultats pour la culture des rickettsies dans le poumon. La souris, qui passait pour insensible au virus typhique historique, localise au contraire d'une façon remarquable l'infection au niveau de cet organe. Paul Durand et Hélène Sparrow ont réussi de magnifiques cultures *in vivo* au départ du pou infecté par voie rectale. Le lapin, animal de choix pour les cultures locales de rickettsies, devait être étudié tout particulièrement dans ce but et l'intérêt de cette recherche était d'autant plus grand que le volume important de son poumon permettait d'escompter des récoltes abondantes de tissu infecté.

Les résultats que nous allons rapporter sont basés sur 51 lapins.

La souche employée est la souche pulmonaire de Paul Durand et Hélène Sparrow que nous entretenons par passages ininterrompus sur souris. Pour diminuer la résistance spontanée à l'infection, nous nous sommes servis de lapins de races sélectionnées, d'animaux irradiés aux rayons X ou splénectomisés, éthyroïdés, anesthésiés, paralysés, collodionnés, saignés, ayant reçu des antigènes toxiques, tondus, maintenus dans une enceinte refroidie.

Ce sont surtout les trois dernières techniques citées que nous avons employées. Voici les différentes modalités des réactions.

#### RÉACTIONS DU LAPIN INOCULÉ AVEC LE POUMON DE SOURIS.

Les lapins, préparés et anesthésiés à l'éther, sont inoculés par voie trachéale avec un poumon de souris broyé, dilué dans 5 à 10 cent. cubes d'un mélange de liquide de tyrode et de sérum de cheval au 1/6. Les réactions thermiques sont assez variables, de même que l'évolution de la maladie. Le lendemain de l'inoculation, la température est souvent normale, quelquefois à 36°-37°, d'autres fois d'emblée au-dessus de 40°. Généralement elle atteint et dépasse 40° le troisième



jour et reste élevée pendant cinq jours si la mort ne survient pas vers le sixième ou le septième jour en hypothermie.

Le maximum de l'infection pulmonaire correspond aux cinquième, sixième, septième jours et, à ce moment-là, la température est soit au-dessous de la normale, soit au-dessus de 40° pouvant atteindre 41°. La respiration est rapide, superficielle, les flancs des animaux battent. Les poumons présentent une hépatisation totale soit rouge, soit grise. Plus rarement ils sont seulement congestionnés n'ayant que quelques lobes hépatisés. Sortis de la cavité thoracique, ils ne s'affaissent pas et leur poids très augmenté varie, suivant la taille de l'animal, entre 40 et 90 grammes; plus rarement ils ne pèsent que de 18 à 30 grammes.

Histologiquement, avec A. Giroud, nous avons vu que dans les parties hépatisées, les alvéoles et les bronches sont remplis de cellules généralement épithéliales. Il y a aussi parfois des foyers de suppuration à polynucléaires.

Dans les parties non hépatisées on constate de légères lésions péribronchiques s'accompagnant toujours de cellules rondes et de cellules épithélioïdes ou même de symplastes. Les alvéoles sont remplis d'œdème ou sont emphysémateux.

Les frottis et les coupes permettent la mise en évidence de rickettsies abondantes qui bourrent les cellules. Ces éléments sont quelquefois remplacés par des corps arrondis de 1 à 2  $\mu$  disséminés dans le protoplasme cellulaire, se colorant en rubis par la méthode de Macchiavello. Les rickettsies vues chez le lapin sont soit de taille normale, soit plus longues, flexueuses, d'allure vibrionienne.

Il est très important de signaler que la présence de bactéries est exceptionnelle. En effet, l'ensemencement systématique du poumon en milieu nutritif liquide et sur gélose-sérum-extrait globulaire est presque toujours négatif.

Nous allons citer quelques exemples qui montrent le comportement du lapin à l'infection pulmonaire rickettsienne.

*Exemples :* Le lapin C 64 est inoculé par voie trachéale avec un poumon de souris morte au quatrième jour. Ce poumon est hépatisé et renferme d'innombrables rickettsies. La température du lapin atteint 40° le quatrième jour, elle est à 37°2 le septième jour. Les poumons présentent une hépatisation grise et pèsent 64 grammes. Les frottis du

poumon droit montrent des corps rubis dans le protoplasme des cellules. Le gauche renferme de très nombreuses rickettsies. Le foie et l'intestin sont normaux, la rate petite.

La lapine B 79 reçoit dans la trachée un poumon très riche en rickettsies prélevé sur une souris sacrifiée au troisième jour. La température est entre 40° et 41° du deuxième au quatrième jour, elle est à 37° le sixième jour. Les poumons pèsent 70 grammes, ils sont hépatisés, grisâtres, pas de rickettsies visibles, corps rubis intracellulaires. Le foie et la rate sont énormes, cette dernière est congestionnée et recouverte d'un exsudat. Le cœur est gros et mou.

Le lapin B 76 est infecté avec un poumon de souris sacrifiée au troisième jour de l'inoculation. Les rickettsies sont abondantes. Le lendemain, la température est à 36°8, elle atteint et dépasse 40° à partir du quatrième jour. L'animal est sacrifié le septième jour. Le foie et l'intestin sont congestionnés, la rate est grosse. Les poumons pèsent 37 grammes ; ils sont hépatisés, l'un grisâtre, l'autre rouge foncé. Ils contiennent des rickettsies libres, des corps rubis et d'énormes amas rubis intracellulaires formés par des rickettsies.

#### MISE EN ÉVIDENCE DE LA VIRULENCE DU POUMON DE LAPIN.

I. DOSAGE DANS LA PEAU DU LAPIN. — Au cours de nos recherches sur les modifications du virus historique conservé sur cobaye, étudiant l'influence des régimes plus ou moins vitaminés sur la présence ou l'absence de rickettsies au niveau des vaginales, nous avons constaté que les cellules parasitées provoquaient dans la peau du lapin une réaction locale.

Les rickettsies du typhus historique, provenant du tissu pulmonaire de la souris, donnent les mêmes réactions (P. Durand, P. Giroud, H. Sparrow), et le tissu pulmonaire du lapin contenant des rickettsies se comporte d'une façon analogue.

La virulence des poumons de lapin a été appréciée dans la peau par l'inoculation de suspensions diluées. Ces suspensions ne provoquent des réactions locales que jusqu'au 1/4.000, tandis que celles faites avec les poumons de souris donnent des résultats positifs même au 1/10.000. Bien que leur pouvoir infectieux soit donc inférieur, ce résultat est intéressant, si l'on considère que le poids du poumon de lapin est de 30 à 40 grammes, tandis que le poids du poumon de souris n'est que de 0 gr. 40 à 0 gr. 60.

*Exemple : Dosage d'un poumon de lapin inoculé par voie respiratoire.* — Le lapin A 2 a été infecté avec un poumon de souris riche en

rickettsies. Cet animal avait été inoculé quatre jours auparavant et quand on l'a sacrifié sa température était descendue à 27°. Cinq jours après nous avons vu à l'examen que les deux poumons du lapin étaient hépatisés. Sur frottis nous n'avons pas mis en évidence de rickettsies, mais des corpuscules intracellulaires colorés en rubis au Macchiavello et en bleu au Castaneda. Testé dans la peau de deux autres lapins (E 81 et A 6), le poumon dilué au 1/8.000 ne provoque qu'une légère réaction transitoire et au 1/4.000 une réaction importante.

**Dosage de la virulence du poumon de lapin A 2. Des suspensions de poumon de lapin A 2 à des dilutions différentes sont inoculées dans la peau des lapins E 81 et A 6 pour le dosage de leur virulence.**

DOSES de virus	DURÉE DU TEST							
	2	3	4	5	6	7	8	9
<i>Lapin E 81 :</i>								
1/8.000 . . . . .	E	e	$\left\{ \begin{array}{c} + \\ - \\ e \end{array} \right\}$	e	?		f	f
1/4.000 . . . . .	E	$\left\{ \begin{array}{c} + \\ - \\ e \end{array} \right\}$	++	++	+		$\left\{ \begin{array}{c} + \\ \text{nod} \end{array} \right\}$	nod
1/2.000 . . . . .	E	$\left\{ \begin{array}{c} + \\ - \\ e \end{array} \right\}$	+	++	++		$\left\{ \begin{array}{c} ++ \\ \text{nod} \end{array} \right\}$	nod
<i>Lapin A 6 :</i>								
1/1.000 . . . . .	E	$\left\{ \begin{array}{c} e \\ + \\ - \end{array} \right\}$	$\left\{ \begin{array}{c} + \\ - \end{array} \right\}$	$\left\{ \begin{array}{c} + \\ - \end{array} \right\}$	$\left\{ \begin{array}{c} + \\ - \end{array} \right\}$	f	f	f
1/500 . . . . .	E	$\left\{ \begin{array}{c} E \\ + \\ - \end{array} \right\}$	$\left\{ \begin{array}{c} ++ \\ e \end{array} \right\}$	$\left\{ \begin{array}{c} ++ \\ n \end{array} \right\}$	++	$\left\{ \begin{array}{c} ++ \\ f \end{array} \right\}$	$\left\{ \begin{array}{c} ++ \\ f \end{array} \right\}$	$\left\{ \begin{array}{c} + \\ f \end{array} \right\}$
1/50 . . . . .	E	$\left\{ \begin{array}{c} E \\ + \\ - \end{array} \right\}$	$\left\{ \begin{array}{c} ++ \\ e \end{array} \right\}$	++	++	$\left\{ \begin{array}{c} ++ \\ f \end{array} \right\}$	$\left\{ \begin{array}{c} ++ \\ f \end{array} \right\}$	$\left\{ \begin{array}{c} ++ \\ f \end{array} \right\}$
1/25 . . . . .	E	$\left\{ \begin{array}{c} E \\ + \\ - \end{array} \right\}$	$\left\{ \begin{array}{c} ++ \\ e \end{array} \right\}$	$\left\{ \begin{array}{c} ++ \\ n \end{array} \right\}$	++	$\left\{ \begin{array}{c} ++ \\ f \end{array} \right\}$	$\left\{ \begin{array}{c} ++ \\ f \end{array} \right\}$	$\left\{ \begin{array}{c} ++ \\ f \end{array} \right\}$
n, nécrose; +, réaction nodulaire; E, grand érythème; e, érythème; n, nodulo; f, réaction furfuracée.								

**II. RÉACTION DU COBAYE INOCULÉ DANS LE PÉRITOINE. —** L'inoculation de poumon très infecté dans le péritoine du cobaye



donne une maladie avec incubation courte. L'animal présente à l'autopsie, au niveau des vaginales, un très important exsudat bourré de rickettsies. Un passage peu riche provoque une maladie typhique semblable à celle que les cobayes présentent habituellement au cours des passages.

*Exemple :* La suspension du poumon du même lapin A 2 inoculé dans le péritoine du cobaye E 82 provoque chez celui-ci une maladie avec incubation de quarante-huit heures s'accompagnant de réaction scrotale. Cet animal, sacrifié au quatrième jour, présente au niveau des vaginales un exsudat très abondant qui revêt l'aspect d'une véritable fausse membrane. Le poumon a un seul point de congestion près du hile. Un frottis de vaginale révèle de très nombreuses cellules parasitées par les rickettsies et de très rares éléments libres de forme longue.

On voit donc que les poumons de lapin, quoique très virulents, le sont moins que les poumons de souris.

#### PASSAGES DE LAPIN A LAPIN.

Les animaux recevant dans la trachée du broyage de poumon réagissent à peu près comme ceux inoculés avec des poumons de souris, à condition de partir d'organes riches en rickettsies.

Les réactions thermiques sont cependant moins importantes ainsi que les lésions pulmonaires et les poumons ne pèsent que de 20 à 30 grammes. Dans les frottis on constate de très nombreux corps rouges, mais de très rares rickettsies.

*Exemple :* Le lapin B 86 reçoit dans la trachée 0 gr. 60 de poumon de lapin, ce dernier étant sacrifié au septième jour quand la température était à 37°5. Ses poumons contenaient des rickettsies libres et des corps rouges. La température de l'animal inoculé atteint 40°3 le cinquième jour et 41° le septième, jour où il est sacrifié. On trouve une myocardite, le foie et la rate sont congestionnés. Les poumons, qui pèsent 27 grammes, ont dans les cellules de très nombreux corps rouges en amas et quelques rickettsies libres.

#### TECHNIQUE POUR LA PRÉPARATION DES SUSPENSIONS.

L'importance du poids des poumons de lapin permettait d'escompter une production intéressante de suspension virulente. Pour qu'il n'y ait que peu de différence au point de

vue antigène entre les suspensions faites avec les organes de souris et celles faites avec les organes de lapin, nous avons pris un poids double de poumon de ce dernier par rapport au poumon de souris. En effet, d'après les dosages, le poumon de cet animal est au moins deux fois plus riche que celui du lapin.

Un poumon de souris de 0 gr. 30 pourra être dilué dans 20 cent. cubes, un poumon de lapin de 40 grammes pourra l'être dans 660 cent. cubes.

Les organes, après avoir été broyés avec l'appareil de Latapie et aux perles d'acier, sont mis en suspension dans l'eau physiologique formolée à 2 p. 1.000, traités ensuite par centrifugations fractionnées et les culots où sont concentrés les rickettsies sont dilués et formolés à 2 p. 1.000.

#### POUVOIR ANTIGÈNE DES SUSPENSIONS.

#### IMMUNITÉ PROVOQUÉE CHEZ LE COBAYE.

Le pouvoir antigène vrai d'une suspension ne peut être jugé que par l'immunité active qu'elle provoque. Cette recherche est rendue difficile du fait de la possibilité, au cours des passages, des variations de virulence dans la souche employée pour l'épreuve. Ces variations que nous avons signalées qualitativement avec le virus historique (4), puis quantitativement avec le typhus murin (5) sont dues à la fatigue, aux différents régimes et peuvent être rencontrées au décours des infections intercurrentes. Elles sont au moins de 1 à 10 et quelquefois de 1 à 100 et plus. Nous avons pu les apprécier d'une façon sûre avec les divers virus en observant les réactions locales de la peau.

Le sang total, qui a souvent servi pour les épreuves, est à rejeter à cause des quantités variables d'anticorps contenus dans le sérum. Par contre, la technique du caillot broyé, technique que nous avons employée pour la mise en évidence des virus typhique et boutonneux pendant et après la période

(4) GIROUD (P.). *C. R. Soc. Biol.*, **121**, 1936, p. 312.

(5) GIROUD (P.). *C. R. Soc. Biol.*, **127**, 1938, p. 864.

fébrile (6) et dans la prospection des maladies inapparentes (7), peut servir pour la recherche de l'immunité.

Les cobayes auxquels nous avons injecté nos suspensions ont été ensuite éprouvés par cette méthode et ont reçu dans le péritoine 1 cent. cube de caillot broyé dilué au 1/2, ce qui constitue un test très rigoureux puisque le 1/1.000 de centimètre cube de caillot donne aussi la maladie.

STABILITÉ DE CES SUSPENSIONS. — Des suspensions préparées au départ de poumons de lapin conservés vingt-quatre heures à  $-40^{\circ}$  ont été employées comme antigène cent trente-cinq jours après. Inoculées trois fois sous la peau, à huit jours d'intervalle, à la dose de 1 cent. cube, elles donnent une immunité complète quinze jours après. D'autres, préparées avec des organes conservés six jours à  $-40^{\circ}$ , ont été injectées deux cent vingt jours après, par voie sous-cutanée, aux mêmes doses et avec le même intervalle. L'épreuve a été faite par voie péritonéale trente-trois jours après avec le virus historique. 2 cobayes sur 4 font un clocher thermique à  $40^{\circ}$  le onzième jour.

On constate donc que :

1° Les suspensions formolées obtenues au départ de poumon de lapin vaccinent.

2° Elles peuvent provenir d'organes gelés depuis quelques jours.

3° Elles peuvent être utilisées un temps très long après leur préparation.

#### COMPARAISON ENTRE LE POUVOIR ANTIGÈNE DES SUSPENSIONS DE POUMON DE SOURIS ET LE POUVOIR ANTIGÈNE DES SUSPENSIONS DE POUMON DE LAPIN.

Nous avons voulu juger comparativement le pouvoir antigène des suspensions venant des poumons de lapin et celui des suspensions provenant des poumons de souris formolées

(6) GIROUD (P.). *C. R. Soc. Biol.*, **120**, 1935, p. 1193.

(7) GIROUD (P.). *Arch. Inst. Pasteur Tunis*, **25**, 1935, p. 74-81.



ou phéniquées, les injections étant répétées trois fois, à huit jours d'intervalle.

a) *Suspensions formolées de poumons de souris.* — Les cobayes reçoivent des suspensions préparées le jour même ou après quarante-huit heures de glacière à  $-10^{\circ}$  et gardées soixante-dix jours à  $8^{\circ}$ . En comparant les résultats avec ceux obtenus dans l'expérience témoin nous constatons que l'immunité est complète vis-à-vis du virus historique injecté dans le péritoine. Il n'y a pas de grande différence au point de vue antigène entre les suspensions formolées de lapin et de souris.

b) *Suspensions phéniquées de poumons de souris.* — Les suspensions phéniquées à 3 p. 1.000 sont préparées avec ou sans conservation en glacière à  $-10^{\circ}$  et employées cent vingt-huit et cent trente-sept jours après. Deux cobayes, ainsi traités, ont une immunité complète contre l'injection péritonéale de virus historique, 2 autres font un clocher thermique le onzième jour entre  $40^{\circ}$  et  $40^{\circ}5$ . Les autres animaux vaccinés témoins se comportent de même. Les résultats obtenus avec les suspensions formolées de poumons de lapin et les suspensions phéniquées à 3 p. 1.000 de poumons de souris sont tout à fait comparables.

**POUVOIR ANTIGÈNE DE SUSPENSIONS CONTENANT DE RARES RICKETTSIES.** — Pour cette expérience concernant le pouvoir antigène de suspensions faites aux dépens de tissus peu riches en rickettsies, nous nous sommes servis de poumons de lapins infectés au départ de poumons de lapin.

Les suspensions préparées au départ de poumons conservés vingt-quatre heures à  $-10^{\circ}$  ont été employées cinq jours après. Huit cobayes reçoivent trois fois dans la peau la suspension, à deux et trois jours d'intervalle. Eprouvés quinze jours après, 2 cobayes font un clocher thermique à  $40^{\circ}$ , 1 autre trois poussées thermiques tandis que les 5 derniers font des typhus soit légers, soit intenses.

La suspension pauvre en rickettsies n'a donné qu'une immunité très légère.

**POUVOIR ANTIGÈNE D'UNE SUSPENSION DE TISSU NE CONTENANT PAS DE RICKETTSIES.** — Une suspension ne contenant pas de

rickettsies sert à vacciner des cobayes qui sont éprouvés trente-trois jours après par voie péritonéale. L'un fait un typhus net à partir du onzième jour, l'autre une fièvre à 40°, 40°2, 40° les onzième, quinzième et seizième jours.

La suspension de tissus ne contenant pas de rickettsies n'a pas vacciné les cobayes. Une suspension n'est donc antigène qu'autant qu'elle est faite avec des poumons riches en rickettsies.

#### POUVOIR ANTIGÈNE DES SUSPENSIONS CHEZ L'HOMME.

On a cherché comparativement le pouvoir antigène de suspension venant de la souris ou du lapin chez 14 sujets n'ayant jamais quitté la métropole et n'ayant pu faire de typhus exanthématique à la période où ils ont été traités (8). Ils avaient avant la vaccination une réaction de Weil et Felix et un test de séro-protection négatifs.

Les injections, vu l'intérêt que présente une vaccination rapide, ont été faites à des intervalles très courts. On a employé soit la voie sous-cutanée, soit la voie intradermique. Sept sujets ont reçu 3 injections à trois et quatre jours d'intervalle, 7 autres 5 injections faites avec des intervalles de trois, quatre, dix et cinq jours. On a noté l'absence de réaction thermique importante ainsi que l'absence de réaction locale pour les injections sous-cutanées. Les injections intradermiques ont provoqué de petits nodules.

Enfin les sérums de ces individus ont été suivis au point de vue de la réaction de Weil-Felix avec les souches de Proteus OX 19, OX 2, OXK, OXL, et l'on a comparé le résultat de cette réaction avec notre test de séro-protection cutanée.

#### VOIE SOUS-CUTANÉE.

RICKETTSIES DE SOURIS. — *Sujet n° 3.* — Après 3 injections de 1 cent. cube, la réaction de Weil et Felix est positive à 200 à partir du quatrième jour. Le test de séro-protection cutanée est positif au vingt et unième jour.

*Sujet n° 4.* — Après 3 injections de 1 cent. cube, la réaction de Weil et Felix est positive à 100 à partir du quatrième jour.

(8) Nous sommes heureux de remercier ici le Dr Ducostet de son précieux concours.

Après 5 injections, le taux de la réaction de Weil et Felix n'est pas modifié sept jours après ; il est positif à 200 au vingt-cinquième jour. Test de séro-protection cutanée positif vingt-cinq jours après.

*Sujet n° 7.* — Après 3 injections de 1 cent. cube, la réaction de Weil et Felix est légèrement positive à  $\pm 50$  à partir du dixième jour. (Le test n'a pu être fait.)

*Sujet n° 8.* — Après 3 injections de 1 cent. cube, la réaction de Weil et Felix est négative même dix jours après.

Après 5 injections, la réaction de Weil et Felix est légèrement positive à  $\pm 50$  six jours après, négative vingt-quatre jours après, tandis que le test de séro-protection cutanée est positif six jours après la cinquième vaccination.

**RICKETTSIES DE LAPIN.** — *Sujet n° 11.* — Après 3 injections de 1 cent. cube, la réaction de Weil et Felix passe du quatrième au vingt et unième jour de  $\pm 50$  à  $\pm 100$  à  $\pm 50$ . Le test de séro-protection cutanée est positif au quarantième jour.

*Sujet n° 12.* — Après 3 injections de 1 cent. cube, la réaction de Weil et Felix est positive à  $\pm 100$  à partir du dixième jour. Après 5 injections elle est légèrement positive à  $\pm 50$  six jours après puis négative. Le test cutané est positif au vingt-cinquième jour alors que la réaction de Weil et Felix est négative.

*Sujet n° 14.* — Après 3 injections de 1 cent. cube, la réaction de Weil et Felix est légèrement positive à  $\pm 50$  quatre jours après, à  $\pm 100$  dix jours après. Après 5 injections la réaction de Weil et Felix est légèrement positive à  $\pm 50$  six jours après, puis négative. Vingt-cinq jours après le test est positif alors que la réaction de Weil et Felix est négative.

#### VOIE INTRA-DERMIQUE.

**RICKETTSIES DE SOURIS.** — *Sujet n° 1.* — Après 3 injections de 0 c. c. 2, 1 cent. cube, 1 cent. cube, la réaction de Weil et Felix est positive dès le quatrième jour à + 100, elle l'est à + 200 le dixième jour. Le test est positif dès le troisième jour.

*Sujet n° 2.* — Après 3 injections de 0 c. c. 2, la réaction de Weil et Felix est restée négative tandis que le test est positif le vingt et unième jour.

*Sujet n° 3.* — Après 3 injections de 0 c. c. 2, 1 cent. cube, 1 cent. cube, la réaction de Weil et Felix est positive à + 200 dès le quatrième jour.

*Sujet n° 6.* — Après 3 injections de 0 c. c. 2, la réaction de Weil et Felix est positive à + 100 le quatrième jour et à + 200 dix jours après. Après 5 injections de 0 c. c. 2, la réaction de Weil et Felix est positive à  $\pm 200$  le sixième jour, le vingt-quatrième jour elle n'est plus que légèrement positive à  $\pm 50$ . Le test est très légèrement positif six jours après la cinquième injection.

**RICKETTSIES DE LAPIN.** — *Sujet n° 9.* — Après 3 injections de 0 c. c. 2, 0 c. c. 8, 1 cent. cube, la réaction de Weil et Felix est positive à + 200 dès le quatrième jour, négative le quarantième jour. Le test est inversé ou nul les vingt-deuxième et quarantième jours.



*Sujet n° 10.* — Après 3 injections de 0 c. c. 2, la réaction de Weil et Felix n'est positive qu'au dixième jour.

Après 2 autres injections de 0 c. c. 2, la réaction de Weil et Felix est légèrement positive à  $\pm 50$  au sixième jour, négative le vingt-quatrième. Le test est très légèrement positif vingt-quatre jours après la cinquième injection.

*Sujet n° 13.* — Après 3 injections de 0 c. c. 2, 1 cent. cube, 1 cent. cube, la réaction de Weil et Felix est négative même dix jours après. Après 5 injections de 0 c. c. 2, 1 cent. cube, 1 cent. cube, 1 cent. cube, 1 cent. cube, la réaction de Weil et Felix est très légèrement positive à  $\pm 50$  au quatrième jour, puis négative. Le test est négatif au sixième jour et très légèrement positif le vingt-cinquième.

De ces résumés on peut conclure que cette vaccination ne provoque aucune réaction générale chez l'homme et que le mode d'inoculation intervient peu. Enfin les antigènes faits aux dépens du poumon de lapin produisent chez l'homme des anticorps comme ceux venant de la souris, mêmes agglutinines anti-Proteus X, mêmes rickettsiolysines mises en évidence par le test de séro-protection cutanée.

La réaction de Weil et Felix permet la mise en évidence d'anticorps particuliers. Les résultats donnés par le test de séro-protection cutanée ne sont pas parallèles à ceux donnés par la réaction de Weil et Felix. Le test peut être soit négatif, traduisant l'absence de pouvoir neutralisant du sérum vis-à-vis de la dose de virus, soit inversé, montrant un véritable pouvoir sensibilisateur local du sérum, soit positif, démontrant son pouvoir virulicide.

### RÉSUMÉ.

1° Le lapin inoculé par voie respiratoire localise remarquablement bien au niveau de son poumon les rickettsies du typhus historique.

2° Le dosage du poumon dans la peau suivant notre méthode permet d'apprécier facilement sa virulence. Celle-ci est inférieure à celle du poumon de souris, mais le volume important du poumon de lapin permet une production intéressante de suspensions virulentes.

3° Les cobayes vaccinés avec des suspensions de rickettsies de lapin formolées sont immuns comme ceux vaccinés avec

des suspensions de rickettsies de souris formolées ou phéniquées prises comme témoin.

4° On peut garder à basse température pendant un certain temps les poumons infectés.

5° Les suspensions peuvent être utilisées longtemps après leur préparation.

6° Les inoculations répétées d'antigène à l'homme ne sont suivies d'aucune réaction générale, elles provoquent des anticorps anti-Proteus mis en évidence par la réaction de Weil et Felix et des anticorps virulicides décelés par le test de séro-protection cutanée.

## DOSAGES D'URÉE DANS LE SANG DE LAPINS AU COURS DE LA TUBERCULOSE EXPÉRIMENTALE

par F. VAN DEINSE et J. SOLOMIDÈS.

(*Institut Pasteur,  
Laboratoires de recherches sur la tuberculose.*)

En 1935 et 1936, E.-S. Panayotopoulo (1) a effectué une série de recherches, dans notre laboratoire, sur les modifications de la composition chimique du sang des lapins, au cours de la tuberculose « Yersin ». Ces recherches ont porté sur le taux des acides aminés dans le sang, sur l'index tyrosine des polypeptides sériques et sur la glycémie expérimentale. Un renseignement important manquait encore dans le faisceau de symptômes rassemblés au cours de l'étude expérimentale de cette forme de tuberculose aiguë décrite pour la première fois par Yersin, étude à laquelle nous avons consacré plusieurs Mémoires (2). Ce renseignement concernait le taux de l'urée sanguine.

Nous avons déjà rapporté, avec N. Fethke, dans une note publiée à la Société de Biologie, quelques résultats de nos recherches sur l'urémie au cours de la tuberculose « Yersin » chez le lapin (3). Nous n'avons pas seulement continué ces recherches, mais nous avons cru utile de les étendre à d'autres formes de tuberculose du lapin, notamment les infections, causées par des doses moins élevées de bacilles, évoluant avec moins de véhémence que la tuberculose « Yersin », d'un caractère si particulièrement aigu. Les observations auxquelles ces recherches ont donné lieu forment le sujet du présent Mémoire.

(1) *C. R. Soc. de Biol.*, **120**, 1935, p. 604 ; **120**, 1935, p. 695 ; **122**, 1936, p. 275.

(2) *Ces Annales*, **59**, 1937, p. 182 ; **63**, 1939, p. 443 et 554.

(3) *C. R. Soc. de Biol.*, **134**, 1940, p. 30.



Pour effectuer les dosages d'urée, nous nous sommes servis du micro-uréomètre d'Ambard (3 bis), qui permet de n'utiliser que deux ou même un seul centimètre cube de sérum, ce qui présente l'avantage qu'on peut saigner les animaux assez fréquemment. Les chiffres que donne cet instrument sont moins exacts, du point de vue chimique, que les valeurs obtenues par la méthode du xanthydrol, mais ils sont tout à fait satisfaisants, quand il s'agit de suivre cliniquement les variations du taux de l'urée chez un même sujet, au cours d'une maladie infectieuse par exemple. Les saignées des lapins en vue du dosage d'urée eurent lieu à la veine marginale de l'oreille, tous les deux à cinq jours pour les cas de tuberculose « Yersin », et à des intervalles plus longs dans les cas d'infection à petite dose.

Avant d'entreprendre les dosages de l'urée dans le sang de lapins infectés par le bacille tuberculeux, nous avons tenu à établir le taux de l'urée chez le lapin normal. Voici les résultats de ces dosages chez 52 lapins neufs :

- 7 lapins neufs avaient de 0 gr. 20 à 0 gr. 29 d'urée par litre de sérum.
- 14 lapins neufs avaient de 0 gr. 30 à 0 gr. 39 d'urée par litre de sérum.
- 14 lapins neufs avaient de 0 gr. 40 à 0 gr. 49 d'urée par litre de sérum.
- 12 lapins neufs avaient de 0 gr. 50 à 0 gr. 60 d'urée par litre de sérum.
- 3 lapins avaient un taux d'urée légèrement au-dessus de 0,60 (de 0,61 à 0,63). 2 lapins neufs, enfin, eurent des taux de 1,13 et de 1,75 respectivement.

En écartant les deux derniers lapins, manifestement urémiques pour une cause inconnue, nous pouvons dire que le taux normal de l'urée sanguine chez le lapin neuf oscille entre 0 gr. 20 et 0 gr. 60 par litre. M. Villaret, L. Justin-Besançon, A. Rubens-Duval et P. Barbier ont trouvé, comme taux normal d'urée chez le lapin, 0 gr. 40 à 0 gr. 60 par litre de sérum (4), ce qui concorde avec nos chiffres en ce sens qu'un taux qui dépasse 0,60 doit être considéré comme trop élevé. Nous avons donc écarté de nos expériences les animaux présentant un taux d'urée supérieur à 0,60.

(3 bis) A l'hypobromite.

(4) C. R. Soc. de Biol., 125, 1937, p. 266.

Nous donnerons maintenant les protocoles de nos expériences en commençant par ceux qui concernent les lapins inoculés avec de fortes doses de bacilles tuberculeux bovins (les cas de tuberculose « Yersin » type bovin) ; ensuite nous reproduirons ceux des animaux inoculés avec des doses modérées de bacilles bovins ; en troisième lieu nous relatons les expériences effectuées chez le lapin avec de fortes doses de bacilles aviaires (tuberculose « Yersin » type aviaire), et finalement les infections aviaires à doses modérées.

I. — *Dosages d'urée chez des lapins inoculés avec de fortes doses de bacilles tuberculeux bovins (tuberculose « Yersin » type bovin).*

*Lapin blanc 230*, inoculé le 5 avril 1940 par voie veineuse avec 2 milligrammes de la culture bovine « Taureau ». Dosages d'urée :

Le 10 avril 1940 : 0,63 par litre.

Le 15 avril 1940 : 0,47 par litre.

Le 17 avril 1940 : 0,35 par litre.

Sacrifié le 22 avril 1940 (mourant). Récolté le sang du cœur, dosage : 1 gr. 24 d'urée par litre.

*Autopsie* : granulie intense des poumons ; rate tuméfiée, douze fois le volume normal ; foie : trame visible ; reins décolorés.

*Histologie* : *Poumon*, pneumonie caséuse massive à bacilles ++. *Foie*, nodules réactionnels disséminés, riches en cellules géantes à bacilles +. *Rate*, bourrée de nodules caséux à bacilles +++. *Rein*, nombreux nodules folliculaires, parfois caséux, bacilles ++.

*Lapin gris 230*, inoculé le 5 avril 1940 par voie veineuse avec 2 milligrammes de la culture bovine « Taureau ». Dosages d'urée :

Le 10 avril 1940 : 0,33 par litre.

Le 15 avril 1940 : 0,40 par litre.

Le 17 avril 1940 : 0,34 par litre.

Meurt le 22 avril 1940.

*Autopsie* : granulie intense des poumons ; rate légèrement tuméfiée. (Pas d'histologie.)

*Lapin gris blanc 236*, inoculé le 5 avril 1940 par voie veineuse avec 2 milligrammes de la culture bovine « Taureau ». Dosages d'urée :

Le 10 avril 1940 : 0,40 par litre.

Le 15 avril 1940 : 0,28 par litre.

Le 17 avril 1940 : 0,62 par litre.

Meurt le 22 avril 1940.

*Autopsie* : poumons très congestionnés, farcis de granulations. Rate légèrement tuméfiée. (Pas d'histologie.)

*Lapin gris 252*, inoculé le 26 janvier 1940 par voie veineuse avec 1 milligramme de la culture bovine « Taureau ». Dosages d'urée :

Le 1<sup>er</sup> février 1940 : 0,38 par litre.

Le 5 février 1940 : 0,61 par litre.

Meurt le 7 février 1940.

*Autopsie* : granulie intense des poumons ; reins marbrés ; rate tuméfiée, six fois le volume normal.

*Histologie* : *Poumon*, nodules folliculaires caséeux confluents, bacilles + + +. *Foie*, nodules réticulaires disséminés en grand nombre, bacilles + +. *Rate*, bourrée de petits nodules réticulo-leucocytaires à bacilles + +. *Rein*, œdème, dégénérescence des glomérules et de quelques tubes contournés.

*Lapin orange 277*, inoculé le 17 février 1940 par voie veineuse avec 1 milligramme de la culture bovine « Taureau ». Dosages d'urée :

Le 19 février 1940 : 0,65 par litre.

Le 24 février 1940 : 0,49 par litre.

Le 1<sup>er</sup> mars 1940 : 0,89 par litre.

Meurt le 3 mars 1940.

*Autopsie* : granulie intense des poumons ; foie couleur feuille morte ; rate tuméfiée, huit fois le volume normal ; reins marbrés.

*Histologie* : *Poumon*, semis de nodules folliculaires à centre caséeux et bacilles + +. *Foie*, de nombreux nodules réticulo-leucocytaires, parfois caséeux, avec plasmods et bacilles +. *Rate*, bourrée de nodules réticulaires à bacilles +. *Rein*, congestion et réaction interstitielle parfois nodulaire, quelques cylindres, quelques dégénérescences.

*Lapin gris 277*, inoculé le 17 février 1940 comme le précédent. Dosages d'urée :

Le 19 février 1940 : 0,54 par litre.

Le 24 février 1940 : 0,54 par litre.

Le 1<sup>er</sup> mars 1940 : 0,86 par litre.

*Autopsie* et *histologie* en tous points comparables au précédent.

*Lapin noir 231*, inoculé le 8 novembre 1939 par voie veineuse avec 1 milligramme de la culture bovine XIV. Dosages d'urée :

Le 14 novembre 1939 : 0,45 par litre.

Le 20 novembre 1939 : 0,58 par litre.

Le 25 novembre 1939 : 0,84 par litre.

Le 1<sup>er</sup> décembre 1939 : 0,90 par litre.

Sacrifié le 4 décembre 1939 (mourant). Récolté 10 cent. cubes de sang au cœur pour dosage d'urée : 0,64 par litre.

*Autopsie* : poumons criblés de granulations ; foie décoloré ; rate légèrement tuméfiée ; reins gonflés (presque deux fois leur volume normal).

*Histologie* : *Poumon*, de nombreux nodules histio-leucocytaires, tendant à la confluence, bacilles nombreux. *Foie*, stéatose très accusée, de nombreux nodules réticulaires disséminés à bacilles +. *Rate*, pulpe blanche et rouge envahies par de larges plages réticulaires à bacilles +. *Rein*, congestion, nodules histio-leucocytaires disséminés avec bacilles + +.

*Lapin blanc 231*, inoculé comme le précédent. Dosages d'urée :

Le 14 novembre 1939 : 0,46 par litre.

Le 20 novembre 1939 : 0,42 par litre.

Le 25 novembre 1939 : 0,71 par litre.

Le 1<sup>er</sup> décembre 1939 : 1,10 par litre.

Meurt le 3 décembre 1939.

Autopsie comme le précédent. Histologie impossible à cause de la putréfaction avancée.

*Lapin brun 234*, inoculé le 8 novembre 1939 par voie veineuse avec 1 milligramme de la culture bovine XIII. Dosages d'urée :

Le 14 novembre 1939 : 0,54 par litre.

Le 20 novembre 1939 : 0,71 par litre.

Le 24 novembre 1939 : 0,63 par litre.

Meurt le 27 novembre 1939.

*Autopsie* : cachexie ; poumons très pâles, criblés de toutes petites granulations ; rate légèrement tuméfiée ; rein gauche couvert de taches d'hémorragie, rein droit couleur jaune pâle.

*Histologie* : *Poumon*, larges zones de condensation histio-lymphocytaire à plasmods et bacilles +. *Foie*, infiltration leucocytaire diffuse et îlots réticulaires disséminés à bacilles rares. *Rate*, infiltration réticulaire massive, pigment ocre abondant dans les histiocytes et plasmods, granulations acido-résistantes. *Rein droit* : nodules réactionnels histio-leucocytaires nombreux. *Rein gauche* : un peu plus touché, un peu plus hémorragique que l'autre.

*Lapin noir 257*, inoculé le 6 janvier 1940 par voie veineuse avec 2 milligrammes de la culture bovine H. Dosages d'urée :

Le 11 janvier 1940 : 0,29 par litre.

Le 15 janvier 1940 : 0,49 par litre.

Le 20 janvier 1940 : 0,88 par litre.

Le 25 janvier 1940 : 0,75 par litre.

Meurt le 26 janvier 1940.

*Autopsie* : poumons vitreux, congestionnés ; rate à peine tuméfiée ; reins marbrés.

*Histologie* : *Poumon*, semis de nodules folliculaires épithélioïdes et réaction des alvéoles voisines. *Foie*, larges placards irréguliers réticulo-leucocytaires, riches en plasmods. *Rate*, prolifération épithélioïde envahissant la pulpe blanche et rouge. *Rein*, infiltration interstitielle diffuse, parfois nodulaire, œdème et dilatation des glomérules et de tubes.

*Lapin brun 257*, inoculé comme le précédent. Dosages d'urée :

Le 11 janvier 1940 : 0,27 par litre.

Le 15 janvier 1940 : 0,59 par litre.

Le 20 janvier 1940 : 0,79 par litre.

Meurt le 24 janvier 1940. Autopsie et histologie comparables au précédent.

## II. — Dosages d'urée chez des lapins inoculés avec de faibles doses de bacilles tuberculeux bovins.

*Lapin gris 254*, inoculé le 12 décembre 1939 par voie veineuse avec 1/200 de milligramme de la culture bovine H. Dosages d'urée :

Le 29 décembre 1939 : 0,31 par litre.

Le 15 janvier 1940 : 0,28 par litre.



Le 1<sup>er</sup> février 1940 : 0,52 par litre.

Le 6 mars 1940 : 1,21 par litre.

Sacrifié le 7 mars 1940.

*Autopsie* : poumons farcis de grosses granulations caséeuses ; rate et foie d'aspect normal. Reins marbrés sans granulations visibles.

*Histologie* : *Poumon*, nodules épithélioïdes confluents formant des masses compactes à plages caséeuses et bacilles +. *Foie*, stase veineuse, de rares petits nodules réticulo-leucocytaires. *Rate*, quelques placards épithélioïdes disséminés, polynucléaires nombreux dans les sinus. *Rein*, pas de dégénérescence épithéliale.

*Lapin brun 255*, inoculé le 12 décembre 1939 par voie veineuse avec 1/200 de milligramme de la culture bovine H. Dosages d'urée :

Le 29 décembre 1939 : 0,24 par litre.

Le 15 janvier 1940 : 0,57 par litre.

Le 1<sup>er</sup> février 1940 : 0,43 par litre.

Meurt le 2 février 1940.

*Autopsie* : pneumococcie; poumons farcis de granulations caséeuses; quelques granulations grises sur le rein droit. (Pas d'histologie.)

*Lapin gris 255*, inoculé le 12 décembre 1939 par voie veineuse avec 1/200 de milligramme de la culture bovine H. Dosages d'urée :

Le 29 décembre 1939 : 0,23 par litre.

Le 15 janvier 1940 : 0,51 par litre.

Le 1<sup>er</sup> février 1940 : 0,36 par litre.

Le 6 mars 1940 : 0,77 par litre.

Meurt le 7 mars 1940.

*Autopsie* : poumons pleins de foyers caséux et broncho-pneumoniques ; rate : plusieurs gros foyers caséux ; reins : plusieurs granulations caséeuses. (Pas d'histologie à cause de la putréfaction avancée.)

### III. — Dosages d'urée chez des lapins inoculés avec de fortes doses de bacilles tuberculeux aviaires.

*Lapin gris 242*, inoculé le 23 novembre 1939 par voie veineuse avec 2 milligrammes de la culture aviaire Tr. XIV. Dosages d'urée :

Le 27 novembre 1939 : 0,61 par litre.

Le 5 décembre 1939 : 0,70 par litre.

Le 7 décembre 1939 : 2,80 par litre.

Meurt le 8 décembre 1939.

*Autopsie* : poumons vitreux ; rate tuméfiée douze fois le volume normal ; foie : trame visible ; reins légèrement tuméfiés, putréfaction commencée (pas d'examen histologique). Frottis foie et rate : de très nombreux bacilles.

*Lapin gris 237*, inoculé le 23 novembre 1939 par voie veineuse avec 2 milligrammes de la culture aviaire Tr. XIV. Dosages d'urée :

Le 27 novembre 1939 : 0,41 par litre.

Le 5 décembre 1939 : 1,03 par litre.

Meurt le 6 décembre 1939.

*Autopsie* : poumons vitreux ; foie décoloré ; rate tuméfiée, huit fois le volume normal ; reins couleur rouge foncé, légèrement tuméfiés.

*Histologie : Poumon*, œdème et infiltration histio-leucocytaire diffuse de la trame sans bacilles visibles. *Foie*, bourré de nodules réticulaires à bacilles +. *Rate*, envahie de prolifération réticulaire massive à bacilles +. *Rein*, congestion, œdème hémorragique des glomérules, dégénérescence granuleuse de quelques tubes contournés et collecteurs.

*Lapin noir 242*, inoculé le 23 novembre 1939 par voie veineuse avec 2 milligrammes de la culture aviaire Tr. XIV. Dosages d'urée :

Le 27 novembre 1939 : 0,39 par litre.

Le 5 décembre 1939 : 1,60 par litre.

Meurt le 6 décembre 1939.

*Autopsie* : poumons congestionnés ; rate tuméfiée dix fois le volume normal ; foie décoloré ; reins pâles.

*Histologie : Poumon*, congestion, œdème hémorragique, infiltration leucocytaire diffuse et nodules épithélioïdes à bacilles ++. *Foie*, infiltration leucocytaire diffuse abondante et nodules réactionnels réticulo-leucocytaires à bacilles ++. *Rate*, envahie de plages réticulaires à bacilles ++. *Rein*, congestion, œdème des glomérules, dégénérescence granuleuse de quelques tubes.

*Lapin gris 257*, inoculé le 17 février 1940 par voie veineuse avec 2 milligrammes de la culture aviaire Tr. XIV. Dosages d'urée :

Le 19 février 1940 : 0,51 par litre.

Le 24 février 1940 : 0,58 par litre.

Le 1<sup>er</sup> mars 1940 : 0,96 par litre.

Le 4 mars 1940 : 0,89 par litre.

Le 7 mars 1940 : 1,84 par litre.

Le 11 mars 1940 : 0,62 par litre.

Sacrifié le 13 mars 1940 (mourant). Récolté le sang du cœur pour dosage d'urée : 0 gr. 31 par litre.

*Autopsie* : poumons sans lésions visibles ; rate tuméfiée six fois le volume normal ; foie, trame très prononcée ; reins gros et marbrés. Récolté 1 cent. cube de liquide limpide dans le péritoine dans lequel le dosage d'urée donne 0 gr. 44 par litre.

*Histologie : Poumon*, nodules folliculaires nombreux disséminés et infiltration diffuse de la trame ; bacilles +. *Foie*, réaction réticulo-leucocytaire en larges placards très riches en plasmodies et en bacilles. *Rate*, réaction réticulaire surtout plasmodiale, bacilles ++++. *Rein*, congestion sans dégénérescence épithéliale.

*Lapin blanc 252*, inoculé le 17 février 1940 par voie veineuse avec 2 milligrammes de la culture aviaire Tr. XIV. Dosages d'urée :

Le 19 février 1940 : 0,56 par litre.

Le 24 février 1940 : 0,51 par litre.

Le 1<sup>er</sup> mars 1940 : 0,89 par litre.

Le 4 mars 1940 : 2,10 par litre.

Meurt le 5 mars 1940.

*Autopsie* : poumons vitreux et en partie congestionnés ; rate colossale, environ vingt-cinq fois le volume normal ; foie, trame très visible et plages de décoloration jaune ; gros reins marbrés. Récolté environ 20 cent. cubes de liquide louche dans le péritoine, dans lequel le dosage d'urée donne 3 gr. 94 par litre.

*Histologie* : *Poumon*, congestion, œdème alvéolaire, infiltration diffuse et nodules folliculaires à bacilles +. *Foie*, infiltration diffuse considérable et hyperplasie réticulaire, bacilles +. *Rate*, œdème, hyperplasie réticulaire, plasmodes, bacilles +. *Rein*, congestion, dégénérescence de quelques tubes.

*Lapin gris 252*, inoculé le 17 février 1940 par voie veineuse avec 2 milligrammes de la culture aviaire Tr. XIV. Dosages d'urée :

Le 19 février 1940 : 0,65 par litre.

Le 24 février 1940 : 0,65 par litre.

Le 1<sup>er</sup> mars 1940 : 0,73 par litre.

Le 4 mars 1940 : 1,05 par litre.

Sacrifié le 4 mars 1940 (mourant).

*Autopsie* : poumons en partie congestionnés ; rate tuméfiée huit fois le volume normal ; foie trame visible ; reins marbrés.

*Histologie* : *Poumon*, infiltration histio-leucocytaire irrégulière de la trame ; bacilles +. *Foie*, envahi par une hyperplasie réticulaire et de l'infiltration leucocytaire diffuse ; bacilles ++. *Rate*, de nombreux nodules réticulaires à bacilles + + +, raréfaction lymphoïde. *Rein*, congestion et dilatation des glomérules et tubes contournés.

#### IV. — Dosages d'urée chez des lapins inoculés avec des doses modérées de bacilles tuberculeux aviaires.

*Lapin blanc 237*, inoculé le 7 décembre 1939 par voie veineuse avec 0 milligr. 1 de la culture aviaire Tr. XIV. Dosages d'urée :

Le 9 décembre 1939 : 0,35 par litre.

Le 13 décembre 1939 : 0,36 par litre.

Le 18 décembre 1939 : 0,30 par litre.

Le 21 décembre 1939 : 0,54 par litre.

Le 26 décembre 1939 : 0,56 par litre.

Le 30 décembre 1939 : 0,60 par litre.

Sacrifié le 30 décembre 1939.

*Autopsie* : poumons d'aspect normal ; foie trame très prononcée ; rate tuméfiée, cinq fois le volume normal ; reins complètement décolorés.

*Histologie* : *Poumon*, petits nodules folliculaires nombreux disséminés à bacilles + +. *Foie*, envahi par des nodules réactionnels en partie nécrosés à bacilles +. *Rate*, prolifération épithélioïde et plasmodiale généralisée ; bacilles + +. *Rein*, congestion, dilatation des glomérules, desquamation de quelques tubes ; petit nodule réactionnel zone médullaire.

*Lapin noir 237*, inoculé le 7 décembre 1939 par voie veineuse avec 0 milligr. 1 de la culture aviaire Tr. XIV. Dosages d'urée :

Le 9 décembre 1939 : 0,50 par litre.

Le 13 décembre 1939 : 0,37 par litre.

Le 23 décembre 1939 : 0,61 par litre.

Le 29 décembre 1939 : 0,75 par litre.

Meurt le 30 décembre 1939.

*Autopsie* : poumons en partie congestionnés ; rate légèrement tuméfiée ; foie trame visible et quelques trainées grises sur la surface ; reins marbrés.

*Histologie : Poumon*, congestion, œdème alvéolaire autour de rares formations nodulaires épithélioïdes à bacilles ++. *Foie*, envahi de plages réactionnelles parfois en voie de nécrose à bacilles ++. *Rate*, prolifération réticulaire intense étouffant les formations lymphoïdes ; bacilles ++. *Rein*, léger œdème des glomérules et dégénérescence limitée des tubes contournés.

*Lapin noir 230*, inoculé le 7 décembre 1939 par voie veineuse avec 0 milligr. 01 de la culture aviaire Tr. XIV. Dosages d'urée :

Le 9 décembre 1939 : 0,20 par litre.

Le 11 décembre 1939 : 0,66 par litre.

Le 16 décembre 1939 : 0,38 par litre.

Le 21 décembre 1939 : 0,65 par litre.

Le 26 décembre 1939 : 0,51 par litre.

Le 2 janvier 1940 : 0,42 par litre.

Sacrifié le 4 janvier 1940. Récolté le sang du cœur pour dosage d'urée : 0,32 par litre.

*Autopsie* : poumons criblés de granulations translucides ; foie, trame très prononcée ; rate tuméfiée deux fois le volume normal et couverte d'un semis de granulations dont plusieurs caséuses ; reins gonflés et marbrés.

*Histologie : Poumon*, semis de nodules histio-leucocytaires parfois nécrotiques, tendant à la confluence ; bacilles +. *Foie*, bourré de nodules épithélioïdes et plasmodes, bacilles +. *Rate*, gros nodules épithélioïdes nécrotiques pulpes blanche et rouge, bacilles +. *Rein*, nodules réactionnels disséminés corticale à bacilles +.

*Lapin blanc 230*, inoculé le 7 décembre 1939 par voie veineuse avec 0 milligr. 01 de la culture aviaire Tr. XIV. Dosages d'urée :

Le 9 décembre 1939 : 0,35 par litre.

Le 11 décembre 1939 : 0,54 par litre.

Le 16 décembre 1939 : 0,39 par litre.

Le 21 décembre 1939 : 0,51 par litre.

Le 26 décembre 1939 : 0,73 par litre.

Le 2 janvier 1940 : 0,77 par litre.

Meurt le 4 janvier 1940.

*Autopsie* : poumons vitreux ; foie trame très accusée ; rate légèrement tuméfiée, couverte d'un semis de granulations ; reins marbrés, décomposition cadavérique commencée (pas d'histologie).

## DISCUSSION.

En parcourant ces protocoles, on voit la différence qui existe, au point de vue anatomique, entre la tuberculose « Yersin » à bacilles bovins et celle causée par le bacille aviaire. Le bacille bovin fait apparaître une granule pulmonaire visible à l'œil nu, alors que le bacille aviaire donne cet aspect vitreux ou congestionné aux poumons, sur lesquels on ne voit guère de granulations à l'œil nu. Seule la souche



bovine H a fait exception à cette règle dans nos expériences, peut-être à cause du caractère un peu spécial de cette souche, qui a été le sujet d'une note à la Société de Biologie (5). Microscopiquement, la tuberculose « Yersin » à bacilles aviaires est caractérisée par une infiltration diffuse de la trame du poumon, que nous ne trouvons pas chez les lapins morts d'une tuberculose « Yersin » à bacilles bovins. Une autre différence typique entre les deux formes d'infection aiguë se rencontre sur les coupes des reins, où le bacille bovin fait apparaître presque toujours des nodules folliculaires, des « tubercules », alors que ces formations font défaut dans les reins des lapins infectés par une forte dose de bacilles aviaires. C'est par ces deux signes qu'on peut distinguer la tuberculose « Yersin » à bacilles bovins de celle causée par le bacille aviaire, et nous avons insisté déjà souvent sur cette différence. (Parmi les animaux de nos expériences, le lapin gris 252 fait exception à cette règle : infecté avec une dose de 1 milligramme de la souche bovine « Taureau », il est mort en douze jours d'une tuberculose « Yersin » avec granulie pulmonaire typique, mais sur les coupes des reins nous n'avons trouvé que des lésions de néphrite banale sans tubercules.) D'autre part, on voit que les faibles doses de bacilles aviaires provoquent des lésions folliculaires macroscopiques et microscopiques : la différence entre l'infection bovine et aviaire que nous venons d'indiquer n'est valable que pour les fortes doses. Ces différences nous ont amenés à attribuer au bacille aviaire un pouvoir pathogène à caractère « toxique », que le bacille bovin ne semble pas posséder au même degré (6).

En ce qui concerne les taux d'urée trouvés chez ces différents groupes de lapins, notons pour commencer les maxima. Dans le premier groupe (« Yersin » bovin), les taux les plus élevés ont été pour les 44 lapins de ce groupe respectivement :

(5) *C. R. Soc. de Biol.*, **139**, 1939, p. 36. Nous rappelons que cette souche bovine a été entretenue simultanément sur pomme de terre glycinée, sur pomme de terre biliée et sur le milieu synthétique de Sauton, et qu'elle est restée très virulente sur ce dernier milieu seulement ; c'est la culture H, entretenue sur Sauton, que nous avons utilisée pour ces expériences sur l'azotémie.

(6) Voir ces *Annales*, *loc. cit.*

1,24, 0,40, 0,62, 0,61, 0,89, 0,86, 0,90, 1,10, 0,63, 0,75, 0,79. Dans le deuxième groupe (3 lapins faibles doses de bacilles bovins) ces chiffres furent : 1,21, 0,57, 0,77. Chez les 6 lapins inoculés avec de fortes doses de bacilles aviaires (« Yersin » aviaire), les valeurs maxima du taux d'urée dans le sérum ont été respectivement : 2,80, 1,03, 1,60, 1,84, 2,10, 1,05. Chez les 4 lapins du dernier groupe enfin (infectés avec des doses modérées de bacilles aviaires) ces taux maxima furent : 0,60, 0,75, 0,65, 0,73.

Un premier fait se dégage de ces chiffres : sur un ensemble de 24 lapins, infectés par la voie intraveineuse avec des bacilles tuberculeux de type aviaire ou bovin, soit à haute dose, soit à dose modérée, 21 ont eu de l'azotémie plus ou moins accusée à un moment quelconque de l'évolution de cette infection mortelle. Un deuxième fait ressort des résultats, c'est que les chiffres les plus élevés ont été constatés chez les lapins inoculés avec une forte dose de bacilles aviaires et qui sont morts par conséquent d'une tuberculose « Yersin » type aviaire. Les 6 lapins appartenant à cette catégorie ont tous eu des taux d'urée dont la valeur a dépassé 1 gramme par litre de sérum, et on trouve même des taux de l'importance de 2,10 et de 2,80. A doses égales, le bacille bovin ne provoque pas d'azotémies aussi intenses que ne le fait le bacille aviaire. Parmi les 11 lapins infectés avec une dose massive de bacilles bovins, morts par conséquent d'une tuberculose « Yersin » de type bovin, 2 seulement ont eu un taux d'urée dépassant 1 gramme par litre de sérum (respectivement 1,10 et 1,24). L'urémie a été beaucoup plus faible chez les animaux qui avaient reçu des bacilles aviaires à dose modérée. Ce n'est donc pas seulement la qualité spécifique du bacille en tant qu'appartenant au type aviaire qui détermine la forte azotémie, mais la dose injectée de ces bacilles fait, elle aussi, valoir son influence. Et sur 3 lapins inoculés avec une faible dose de bacilles bovins, 1 seul a eu un taux d'urée dépassant 1 gramme (1,21).

Voyons maintenant à quel moment de l'évolution de l'infection correspond l'apparition de l'azotémie et quand celle-ci atteint son point le plus élevé. Parmi les 11 lapins du premier groupe (« Yersin » bovin), 1 seul n'a eu aucune élévation du

taux d'urée ; chez les 10 autres, le taux urée a commencé à dépasser la limite de 0,60 respectivement vers le cinquième, le douzième, le dixième, le deuxième, le douzième, le dix-septième, le dix-septième, le douzième, le quatorzième et le quatorzième jour de l'infection. Il semble donc que la plupart de ces animaux ne commencent leur azotémie que vers le dixième jour ou plus tardivement, à part 2, chez lesquels elle a fait son apparition presque d'emblée. Chez 2 lapins du deuxième groupe (faibles doses de bacilles bovins), l'azotémie est apparue à la veille de la mort, survenue après quatre-vingt-six jours. Le troisième lapin de ce groupe n'a pas fait d'azotémie. Chez les 6 lapins du troisième groupe (« Yersin » aviaire), l'azotémie a débuté respectivement vers le quatrième, le douzième, le douzième, le treizième, le treizième et le seizième jour de l'infection, délais comparables à ceux qu'on observe au cours de la tuberculose « Yersin » bovine. Et enfin, chez les 4 lapins du quatrième groupe (infection aviaire à dose modérée), l'azotémie apparaît vers le vingt-troisième, le vingt-deuxième, le quatorzième et le dix-neuvième jour, vers la fin de la vie le plus souvent. Chez les lapins infectés avec des doses modérées de bacilles bovins ou aviaires, on trouve donc en général une azotémie, d'ailleurs peu importante dans la plupart des cas, peu avant la mort ; chez les animaux morts de tuberculose « Yersin », par contre, on constate une tendance prononcée à un retour vers des taux d'urée moins élevés aux approches de la mort, tout au moins chez les sujets qui ont survécu assez longtemps. Seul le lapin blanc 230 fait exception à cette règle : après être descendu de 0,63, point culminant au cinquième jour, à 0,35 cinq jours avant la mort, le taux de l'urée fut de 1,24 dans le sang de cet animal, récolté *post mortem*. Nous avons fait le dosage dans trois autres échantillons de sang, récoltés *post mortem* : chaque fois le taux d'urée trouvé dans ces échantillons était inférieur au dernier taux que nous avons constaté chez l'animal en question avant la mort ; ce sont : le lapin noir 231, inoculé avec 1 milligramme de culture bovine XIV, où le sang pris *post mortem* contenait 0 gr. 64 d'urée par litre (contre 0,90 trois jours avant la mort), le lapin gris 237, inoculé avec 2 milligrammes de culture aviaire Tr. XIV, dont

le sang, récolté à l'autopsie, dosait 0 gr. 31 d'urée contre 0,62 deux jours avant la mort et 1,84 six jours avant ; et le lapin noir 230, inoculé avec 0 milligr. 01 de culture aviaire Tr. XIV, dont le sang, obtenu après la mort, contenait 0 gr. 32 d'urée par litre contre 0,42 deux jours avant.

Nous attirons l'attention sur le lapin blanc 232, chez lequel un dosage, pratiqué la veille de la mort, révéla un taux d'urée sanguine de 2,10, alors que dans le liquide péritonéal, que nous avons pu récolter chez cet animal à l'autopsie, nous avons trouvé 3 gr. 94 d'urée par litre. Il ne nous a pas été possible, malheureusement, de récolter aussi du sang après la mort de cet animal et ainsi nous ne savons pas si le taux d'urée sanguine correspondait, au moment de la mort, avec celui du liquide péritonéal.

Pour essayer d'expliquer l'existence de cette azotémie chez le lapin au cours de la tuberculose, surtout la tuberculose « Yersin » à bacilles aviaires, examinons en premier lieu l'état des reins chez nos animaux d'expérience. (L'examen histologique n'a eu lieu que pour les animaux dont les organes ne montraient encore aucune trace de putréfaction cadavérique.) Sur 17 lapins, chez lesquels l'examen histologique a pu être pratiqué, 1 seul n'avait pas de lésions rénales (le lapin gris 234, inoculé avec 1.200 de milligramme de la culture bovine H) ; et un autre n'avait que de la congestion glomérulaire, sans dégénérescences épithéliales (le lapin gris 237, infecté avec 2 milligrammes de la culture aviaire Tr. XIV). Les 15 autres avaient tous des lésions rénales plus ou moins accusées. Il est connu, grâce aux travaux de Pasteur Vallery-Radot et de W. Nonnenbruch, qu'il existe fréquemment un désaccord entre le trouble fonctionnel du rein (et du foie) et les lésions anatomiques trouvées à l'autopsie et à l'examen histologique. L'examen des coupes des reins, provenant des lapins morts de tuberculose « Yersin » aviaire, ceux par conséquent qui ont eu les azotémies les plus importantes, et qui sont pour cette raison les plus intéressants, montre que seul le lapin 237 n'avait pas d'altérations rénales suffisamment importantes pour expliquer le taux de 1 gr. 84 d'urée trouvé chez lui six jours avant la mort. Les 4 autres lapins de ce groupe, dont les organes ont pu être examinés histolo-



giquement, avaient tous des signes de néphrite toxique plus ou moins prononcés.

Il serait cependant exagéré, croyons-nous, de vouloir attribuer la responsabilité de ces azotémies aux reins seuls. Ces organes ne font que contribuer, probablement, à un syndrome complexe causé par le bouleversement structural de tous les organes vitaux que comporte cette grave infection, et il y a certainement plusieurs facteurs extra-rénaux qui ont leur part importante dans la genèse de cette azotémie. En regardant les coupes du foie, et en constatant les lésions extrêmement graves que cause l'infection tuberculeuse aiguë dans cet organe chez nos lapins, on ne peut pas douter du rôle que le foie doit jouer dans l'azotémie que font ces animaux. Il serait inexact, croyons-nous, de vouloir parler d'une hépato-néphrite aiguë, car les lésions ne se bornent pas électivement aux reins et au foie.

Quand les lésions du foie deviennent telles qu'elles entraînent entièrement la fonction uréopoiétique de cet organe, le taux de l'urée diminue dans le sang et c'est ce qui pourrait expliquer pourquoi, dans certains cas, les chiffres d'urée, après avoir dépassé un point culminant, redescendent souvent à des valeurs inférieures à celles que présentait l'animal à l'état normal, alors que l'intoxication augmente sans cesse. Il est plus que probable que l'azotémie, due aux déchets protéiques non transformés en urée, est un des facteurs dont le concours fait apparaître le tableau clinique d'intoxication grave qui caractérise la tuberculose « Yersin » du lapin.

Nous croyons que l'azotémie si prononcée dans le cas d'une infection massive du lapin par le bacille aviaire, azotémie nettement plus importante que celle que l'infection massive par le bacille bovin semble pouvoir provoquer chez le même animal, est un signe de plus de cette « toxicité » spéciale du bacille tuberculeux aviaire, toxicité sur laquelle l'un de nous a insisté à plusieurs reprises.

#### RÉSUMÉ.

Sur 24 lapins infectés par la voie intraveineuse avec des bacilles tuberculeux de type aviaire ou bovin, soit à haute

dose, soit à dose modérée, 21 ont eu de l'azotémie plus ou moins accusée. Les chiffres les plus élevés (jusqu'à 2 gr. 80 par litre de sérum) ont été constatés chez les lapins, inoculés avec une forte dose de bacilles aviaires, morts de tuberculose « Yersin » de type aviaire. A doses égales, le bacille bovin ne provoque pas d'azotémies aussi intenses que ne le fait le bacille aviaire. Ces azotémies, au cours de la tuberculose « Yersin » de type aviaire ou bovin, ont une tendance, une fois passé un point culminant, à revenir vers des taux moins élevés aux approches de la mort. Chez les lapins infectés avec des doses modérées de bacilles aviaires ou bovins, on trouve en général une azotémie, d'ailleurs peu importante dans la plupart des cas, peu avant la mort. La forte azotémie, causée par le bacille aviaire à haute dose, est considérée comme un signe de la « toxicité » spéciale qui distingue ce germe du bacille tuberculeux bovin (7).

(7) Nous tenons à remercier M. Bablet, qui, avec ses conseils utiles, nous a aidés dans l'interprétation des coupes histologiques.

**REMARQUES**  
**SUR LE RÔLE JOUÉ PAR LE RÉGIME ALIMENTAIRE**  
**ET PAR LA VITAMINE C**  
**DANS LA TUBERCULOSE EXPÉRIMENTALE DU COBAYE**

par J. BRETEY.

*(Institut Pasteur,  
Laboratoires de recherches sur la tuberculose.)*

De tout temps la tuberculose a été considérée comme une maladie de misère, dont la diffusion et l'évolution sont en rapports étroits avec l'alimentation. Les cliniciens ont toujours insisté sur ce fait et l'étude des statistiques a, dans tous les pays, montré l'intérêt que présente, dans la lutte contre cette maladie, l'amélioration des conditions de vie et particulièrement du régime alimentaire de l'homme.

Le dépouillement des observations que l'on a pu faire au cours de la guerre de 1914-1918 sur les populations soumises à des restrictions alimentaires, a apporté de nouvelles preuves de l'augmentation de la morbidité et de la mortalité tuberculeuses, dès que les rations sont diminuées de façon massive en quantité et en qualité. C'est ainsi que dans les Empires centraux et dans les Régions envahies, la mortalité a sensiblement doublé en 1917 à la suite de l'abaissement de la ration à des chiffres compris entre 1.400 et 1.100 calories (Mouriquand [1], Breton et Ducamp [2]). Les circonstances présentes donnent à cette étude un intérêt d'actualité imprévisible au moment où nous avons commencé nos recherches.

A côté des phénomènes dus à l'inanition, c'est-à-dire à l'insuffisance de la quantité des aliments, ceux dus à la carence, c'est-à-dire à leur qualité, ont rapidement pris une place de plus en plus grande, surtout depuis les découvertes de ces dernières années dans le domaine des vitamines.

Pour Mouriquand, Michel et Bertoye [3], le facteur anti-

scorbutique n'intervient pas sur les caractères cliniques et anatomiques de la tuberculose ; mais Coulaud [4], en 1923, confirmé par Bieling [33], montrait que le scorbut aggrave les lésions et accélère l'évolution. Depuis, de nombreuses recherches ont été faites sur l'action des vitamines dans cette maladie. On y relève d'assez nombreuses contradictions. Cependant il est généralement admis que si les vitamines A, B, D peuvent jouer un rôle, c'est le facteur C qui a la plus grande importance. On trouvera une bibliographie très complète jusqu'en 1931 dans le travail de Hagedorn [5] et sans doute aussi, à partir de cette date, dans celui tout récent de Pfaffenberg [6], que nous n'avons pu consulter en raison des circonstances.

Au cours d'expériences sur l'action des corps gras sur la tuberculose expérimentale du cobaye, poursuivies avec L. Nègre pendant plusieurs années, nous avons eu parfois l'impression que les lésions apparaissaient plus ou moins tôt, selon la saison à laquelle était faite l'expérience. Elles semblaient être plus précoces en hiver qu'en été. L'alimentation de nos cobayes se compose pendant la période hivernale de foin, de comprimés d'avoine et de betteraves, éléments dont la teneur en vitamine C est faible. En été, la quantité de foin est réduite et les betteraves sont remplacées par de la luzerne fraîche, plus riche en facteur antiscorbutique. Il était donc justifié d'envisager l'intervention de l'alimentation, ou plus exactement d'une carence. Notre attention était du reste attirée sur ce point par les recherches de P. Giroud [7], qui montraient l'action si importante du régime dans l'étude expérimentale du typhus exanthématique et dans le déclenchement des épidémies.

EXPÉRIENCE I. — Dans une première expérience nous avons comparé l'évolution des lésions d'une tuberculose expérimentale chez des cobayes appartenant à deux lots différents : l'un était au régime ordinaire d'hiver se composant, comme nous l'avons indiqué plus haut, de foin, de comprimés d'avoine et de betteraves (lot 1) ; l'autre recevait au lieu de betteraves une quantité équivalente en poids de fanes de choux (surtout de chou-fleur), soit 50 grammes environ par jour et par cobaye (lot 2). Tous ces animaux avaient été laissés pendant plus de quinze jours au régime ordinaire.

Trois jours après que le lot 2 eut été mis à son nouveau régime, tous les animaux furent inoculés par injection sous la peau de la cuisse



droite de 0 milligr. 001, essoré et pesé, de la souche bovine Chev. I, provenant d'une culture sur milieu de Löwenstein âgée de quinze jours. Tous les animaux survivants furent sacrifiés quarante-deux jours après l'inoculation. Chez les témoins, les lésions ganglionnaires étaient importantes et les tubercules spléniques très nombreux. La moitié des animaux présentait un début de généralisation au foie.

Chez les animaux du lot 2, qui recevaient du chou, nous avons trouvé de petits ganglions inguinaux et sous-lombaires. Les lésions spléniques étaient peu nombreuses, puisque nous relevons deux fois 16 tubercules, deux fois 11, deux fois 7, une fois 3 et trois fois aucune lésion macroscopique. Dans aucun cas il n'y avait de lésions aux autres organes.

Comme le montrent les silhouettes spléniques dessinées à la chambre claire (fig. 4), l'adjonction de fanes de chou à l'alimentation a eu le résultat surprenant de réduire considérablement les lésions. Nous n'attribuons à ce légume aucun caractère de spécificité ; il a été choisi parce qu'il constitue en hiver une source économique et riche en principe antiscorbutique. Il est probable que d'autres végétaux auraient eu une action identique : Leichtentritt [8] dit avoir observé chez des animaux tuberculeux une survie double chez ceux qui recevaient du jus d'orange, par rapport aux témoins. Cependant, dans une expérience que nous ne rapportons pas ici, parce que trop de témoins moururent précocement, la luzerne fraîche n'a pas donné de résultats équivalents.

Il nous parut indispensable de confirmer ces résultats par une nouvelle expérience et de voir s'ils pouvaient être légitimement attribués à la différence en vitamine C ingérée dans chaque lot. A cet effet, des cobayes furent mis à un régime de carence et reçurent des doses exactement connues d'acide l-ascorbique. De tels cobayes qui, par leur régime, étaient soustraits aux influences saisonnières, constituaient aussi des témoins devant permettre de comparer entre elles des expériences faites à des époques différentes de l'année et avec des régimes différents. Les conditions générales de cette seconde expérience furent les suivantes :

EXPÉRIENCE II. — Le régime ordinaire d'hiver était le même que dans l'expérience précédente; ainsi que celui des animaux recevant du chou. Le régime scorbutigène que nous appellerons SMC était celui décrit par Sherman, La Mer et Campbell [9] et d'un emploi courant dans les expériences sur la carence en vitamine C. Lorsqu'il est donné à volonté, il présente le léger inconvénient d'avoir une valeur énergé-



FIG. 1. — Expérience I. A gauche : lot 2, régime avec chou.  
Au milieu et à droite : lot 1, régime d'hiver (témoins).

tique certainement supérieure à celle du régime d'hiver. Il se compose des éléments suivants :

Flocons d'avoine . . . . .	39
Poudre de lait écrémé . . . . .	30
Son . . . . .	20
Graisse de beurre . . . . .	10
Sel de cuisine en poudre . . . . .	1

Pour éliminer la vitamine C, on chauffe pendant trois heures à sec les flocons d'avoine à 110° et la poudre de lait à 100°. Le beurre fondu est filtré deux fois sur gaze et est, ainsi que le sel, intimement mêlé aux autres constituants du régime. On ne prépare que les quantités nécessaires à la consommation de quelques jours. La nourriture est complétée par de l'eau et par du papier filtre (aliment de lest) que l'on peut remplacer par du foin chauffé à l'autoclave.

L'acide l-ascorbique (Hoffmann-La Roche) a été donné par voie buccale sous un faible volume, à la seringue. Les solutions aqueuses étaient préparées extemporanément. Les doses que nous indiquons sont les doses journalières, mais en pratique la distribution était faite tous les deux jours seulement, à une dose double.

Les cobayes, pesant en moyenne 400 grammes avec de faibles écarts de poids, ont été répartis dans les lots suivants :

	COBAYES
1. Régime d'hiver. . . . .	21
2. Régime d'hiver + 2 milligrammes d'acide ascorbique . . . .	18
3. Régime avec chou . . . . .	15
4. Régime SMC + 2 milligrammes d'acide ascorbique . . . . .	15
5. Régime SMC + 0 milligr. 4 d'acide ascorbique . . . . .	15
6. Régime SMC . . . . .	4

Chaque lot a été mis à son régime au moins cinq jours avant l'inoculation virulente.

Celle-ci a été pratiquée, de même que dans la première expérience, par injection sous la peau de la cuisse de 0 milligr. 001, essoré et pesé, de la souche bovine Chev. I, culture sur pomme de terre glycinée, âgée de vingt et un jours. Tous les animaux ont été inoculés avec la même émulsion. Seuls les 4 cobayes du lot 6, mis au régime scorbutigène, sans aucune adjonction de vitamine, n'ont pas été inoculés. Ils moururent du trentième au trente-cinquième jour, après avoir présenté des signes de scorbut, vérifiés à l'autopsie. Le régime était donc convenablement préparé.

Les animaux ont été pesés toutes les semaines. Nous ne donnerons pas ici leurs courbes de poids, car l'expérience n'a pas duré assez longtemps pour que des différences nettes aient pu être observées dans le début de l'amaigrissement des différents lots. Notons cependant que ce sont les cobayes du lot 4, mis au régime scorbutigène avec 2 milligrammes d'acide ascorbique, qui ont le plus augmenté de poids pendant les six semaines qu'a duré l'expérience : 100 grammes en moyenne. C'est la preuve de la valeur nutritive élevée de ce régime lorsqu'on le donne sans limiter la ration.

Les anticorps tuberculeux ont été dosés dans le sang pour 3 cobayes de chaque lot à deux reprises : au trente-sixième et au quarante-quatrième jour de l'expérience. La technique suivie était celle de Calmette et Massol. Les différences observées n'ont pas été caractéristiques.

L'allergie a été mesurée par l'injection intradermique de 0 c. c. 1 de dilutions croissantes de tuberculine brute, et cela à trois reprises : vingt-six, trente-quatre et trente-six jours après l'inoculation, chez tous les animaux. Au vingt-sixième jour, tous les cobayes réagissaient à la dilution au 1/20, et tous, à l'exception de 3, à celle au 1/100. Au trente-quatrième jour, tous réagissaient à la dilution au 1/250 ; avec celle au 1/1.000 les réactions positives observées furent les suivantes : lot 1, 5 cobayes sur 15 ; lot 2, 7 sur 12 ; lot 3, 8 sur 14. Dans le lot 4, tous les 13 cobayes ont donné de fortes réactions. Ces derniers ont reçu deux jours plus tard les dilutions 1/2.000 (11 réactions positives sur 13) et 1/4.000 (7 sur 13). Les cobayes les plus carencés n'ont malheureusement pas été titrés.

Enfin nous devons à l'obligeance de P. Meunier, que nous remercions vivement, d'avoir les résultats de quelques dosages d'acide ascorbique dans le sang, obtenus par la méthode si exacte qu'il a décrite [10]. Les cobayes au régime SMC + 2 milligrammes d'acide ascorbique en avaient 3 milligrammes par litre, soit la moitié environ du chiffre que l'on doit normalement trouver chez des cobayes sains dans ces conditions. Aucune trace n'a été trouvée chez ceux qui n'en recevaient que 0 milligr. 4.

Tous les animaux survivants furent sacrifiés quarante-six jours après l'inoculation. Les lésions trouvées pour chaque lot peuvent être décrites ainsi :

Lot 1 (régime d'hiver. Témoins). 14 survivants. — Ils ont dans l'ensemble de gros ganglions inguinaux et sous-lombaires, de la taille d'un gros pois. Les tubercules sont nombreux sur la rate. Presque tous ont des lésions au foie, parfois quelques petits tubercules sur les poumons.

Lot 2 (régime d'hiver + 2 milligrammes d'acide ascorbique). 12 survivants. — Les lésions ganglionnaires et spléniques ne sont pas réduites de façon très sensible par rapport aux témoins. Aucune lésion n'a été observée au foie, ni aux poumons chez aucun animal.

Lot 3 (régime avec chou). 10 survivants. — De même que dans la première expérience, les ganglions sont moins développés que chez les témoins. Les sous-lombaires sont en général à peine plus gros qu'un grain de blé. Au niveau de la rate, les lésions sont très réduites : le volume de l'organe est normal ou très peu augmenté et le dénombrement des tubercules en montre 17 chez 1 cobaye, 11 chez 1 autre, de 2 à 6 chez 6 ; enfin, 2 n'ont aucune lésion macroscopique. Aucun n'a de lésion au foie.

Lot 4 (régime SMC + 2 milligrammes d'acide ascorbique). 13 survivants. — Les ganglions sont de la taille de ceux des témoins, mais les lésions spléniques sont un peu moins nombreuses. Dans plus de la moitié des cas il y a un début de lésions hépatiques.

Lot 5 (régime SMC + 0 milligr. 4 d'acide ascorbique). 10 survivants. — Ce lot est celui qui présente les lésions les plus graves. Les ganglions sont gros. Les tubercules, innombrables et confluent, cou-



vrent la surface de la rate qui est très augmentée de volume. Le foie présente toujours de nombreuses lésions, plus avancées que dans les autres lots. On trouve toujours quelques tubercules sur les poumons. Aucun animal n'a eu de signes caractéristiques de scorbut pendant les derniers jours de l'expérience et aucune altération macroscopique de cet ordre n'a été trouvée à l'autopsie.

Ces expériences posent la question si controversée du taux normal de la vitamine C chez le cobaye sain, ou plus exactement celle de la quantité d'acide ascorbique que l'on doit lui fournir pour le maintenir dans des conditions normales. La dose journalière considérée comme nécessaire a été progressivement portée de 0 milligr. 5 à 1 milligr. 5 et 2 milligrammes. Elle est inférieure de vingt fois environ à celle qui est nécessaire pour saturer les tissus, comme l'a montré Zilva [11]. Cet auteur pense cependant que 1 milligr. 5 à 2 milligrammes sont suffisants, car cette dose permet la croissance des animaux et les maintient en bon état de santé. Cependant A. Giroud et Leblond ont remarqué dès 1935 [12] « qu'en donnant au cobaye, type des espèces carençables, d'assez fortes doses de vitamine, le taux de ses organes riches ne dépasse guère un certain niveau. On peut considérer le taux ainsi obtenu comme étant le taux normal. De plus, les taux que l'on observe dans ces conditions correspondent à ceux que donnent les organes des animaux non carençables ». A. Giroud fait aussi remarquer que ces quantités sont en rapport avec l'état fonctionnel des organes, comme c'est particulièrement évident pour la surrénale [13]. Ces constatations sont confirmées par Szent-Györgyi [14] pour qui la seule dose qui doit être considérée comme physiologique est celle que le cobaye consomme lorsqu'il s'alimente à sa guise. Ces quantités qui permettent le fonctionnement physiologique des organes sont aussi celles qui correspondent à l'état de saturation. Il est donc logique de penser que la saturation doit aussi être obtenue chez les animaux qui doivent se procurer l'acide ascorbique par leur alimentation. Aussi est-on amené à envisager avec ces auteurs que la dose normale, chez le cobaye, atteint et même dépasse 40 milligrammes.

Néanmoins, dans la seconde expérience, lorsque nous avons cherché à obtenir les mêmes lésions chez les cobayes au régime

scorbutigène que chez les témoins au régime d'hiver, nous avons essayé la dose de 2 milligrammes (lot 4). Elle doit assurer au cobaye sain un taux de 7 milligrammes environ d'acide ascorbique par litre de sang. Les dosages faits par Meunier ont donné un chiffre inférieur de moitié vers la fin de l'expérience. Cette différence tient à ce que les besoins en acide ascorbique sont très augmentés dès que l'activité de l'organisme est accrue. C'est le cas du travail (A. Giroud et R. Ratsimamanga [15]), mais aussi des maladies fébriles (Schroeder [16] ; Harde, Rothstein et Ratsch [17] ; Abbasy, Harris et Marrack [18] ; Degeller [19] ; Wright [20] ; Hasselbach [21] ; Szent-Györgyi [22]). La tuberculose ne fait pas exception, comme de nombreuses publications l'ont confirmé : Hasselbach [21] ; Burkhardt et Weiser [23] ; Gogga et Scholz [24] ; Jetter et Bumbalo [25] ; Scarinci et Mea [26] ; Armand-Delille et Urbain [27] ; Weber [28] ; Marcoux [29]. Aussi les cobayes de ce lot qui recevaient des doses considérées par Zilva comme suffisantes pour la vie normale, n'étaient pas moins précarencés, tout au moins à la fin de l'expérience.

La carence plus prononcée en vitamine C, telle qu'elle a été réalisée dans le lot 5 avec 0 milligr. 4 d'acide ascorbique, s'est accompagnée de la disparition complète de ce corps dans le sang. L'action sur l'évolution de la tuberculose a été déplorable : la diffusion était massive, les rates très augmentées de volume et couvertes de tubercules (fig. 2 et 3). Il semble que l'on puisse utiliser des cobayes ainsi préparés pour le diagnostic d'infections paucibacillaires ou provoquées par des souches peu virulentes. Cependant, dans ce dernier cas, il ne faut pas s'attendre d'après Greene, Steiner et Kramer [30] à exalter par ce moyen la virulence de souches qui l'auraient perdue.

La différence entre les deux lots précédents fait sauter aux yeux l'action très manifeste de l'acide ascorbique sur les animaux carencés, puisque de faibles doses suffisent à rendre l'évolution moins grave que chez les témoins.

Si nous comparons les lots 1 et 4, nous constatons d'abord que les témoins au régime d'hiver ont présenté des lésions absolument comparables à celles des témoins de l'expérience précédente ; nos conditions expérimentales étaient donc ana-

logues. Ces lésions sont un peu plus intenses et plus généralisées que celles des cobayes au régime SMC + 2 milligrammes d'acide ascorbique. On peut en conclure que le taux d'acide ascorbique de la nourriture de nos cobayes au régime d'hiver est inférieur à ce chiffre, sans doute aux environs de 1 milligr. 5. A plus forte raison sommes-nous loin de la dose de saturation.

Les cobayes qui recevaient, outre le régime d'hiver, une ration supplémentaire de 2 milligrammes d'acide ascorbique, soit une dose totale que l'on peut évaluer à 3 milligr. 5 environ, ont présenté des lésions spléniques presque aussi importantes que celles des témoins. Cependant ils n'avaient encore aucune lésion au foie au moment où ils ont été sacrifiés. Ce petit apport d'acide ascorbique a donc eu un effet favorable, mais faible.

La comparaison des lots 1 et 3 nous montre que la substitution du chou à la betterave a considérablement réduit les lésions ganglionnaires et spléniques. Les rates ont des dimensions souvent normales. Au stade où nous avons arrêté l'expérience le foie n'est jamais pris. Sans doute ne peut-on parler d'arrêt total de l'infection tuberculeuse car, sur des fragments de rates en apparence indemnes, nous avons pu par examen histologique trouver quelques petits amas de cellules épithélioïdes et même à ce niveau de très rares bacilles. Mais ceux-ci étaient isolés, intracellulaires, parfois très abîmés et il ne saurait être question d'une multiplication très active. Celle-ci sans doute serait survenue plus tard. L'action frénatrice observée dans la première expérience a donc été reproduite avec la même netteté. Après avoir donné les résultats de la troisième expérience, nous verrons s'il est possible de mettre ces faits à l'actif de l'acide ascorbique.

Comme Madison et Manwaring [31] ont décrit chez le lapin une augmentation de l'ordre de douze fois des anticorps produits par l'injection de sérum de cheval lorsque celle-ci s'accompagne de celle de 100 milligrammes d'acide ascorbique, nous avons recherché si les anticorps tuberculeux étaient plus ou moins abondants dans certains de nos lots. Les chiffres observés n'ont été caractéristiques à aucun point de vue. Le phénomène décrit par ces auteurs doit relever d'un

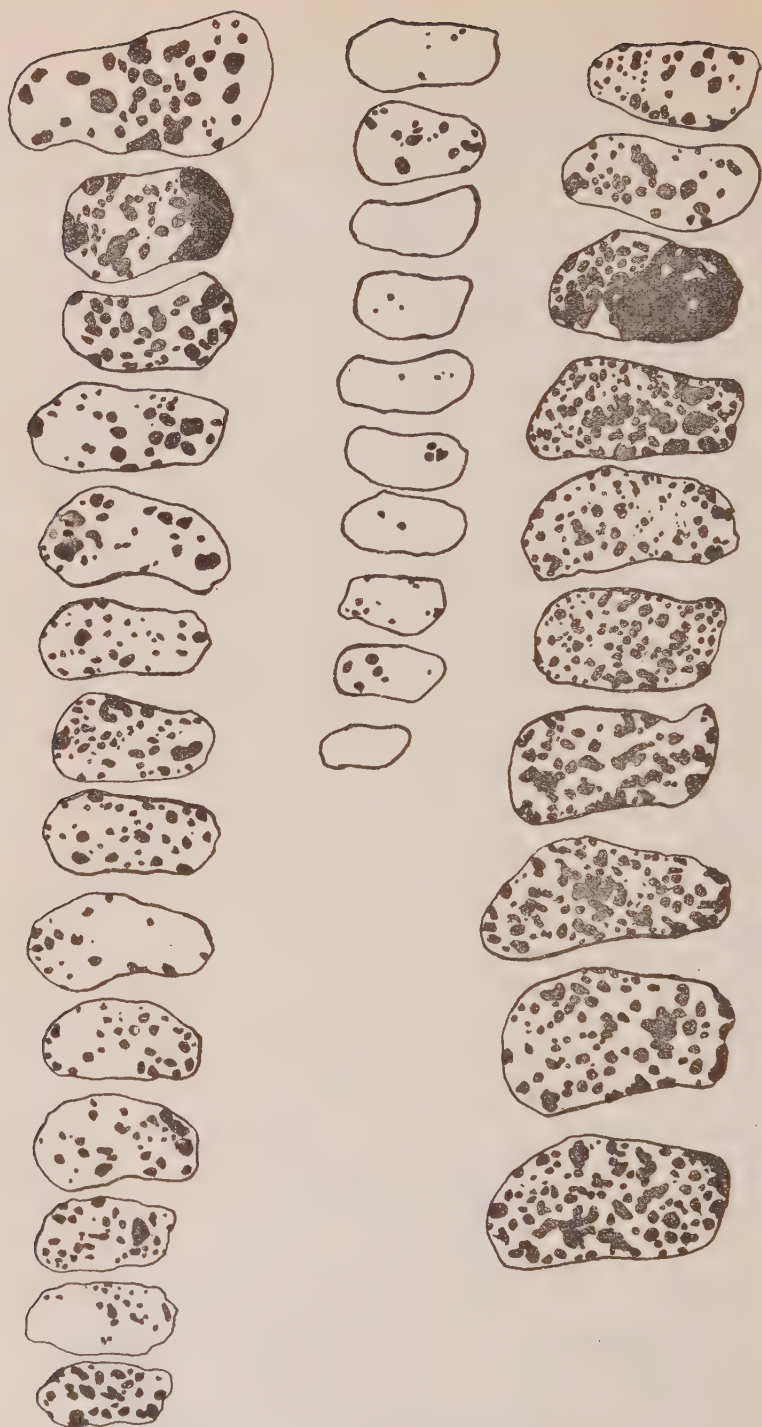


FIG. 2. — Expérience II. De gauche à droite : lot 1, régime d'hiver (témoins); lot 3, régime avec chou; lot 5, régime SMC + 0 milligr. 4 d'acide ascorbique (préscorbétique).



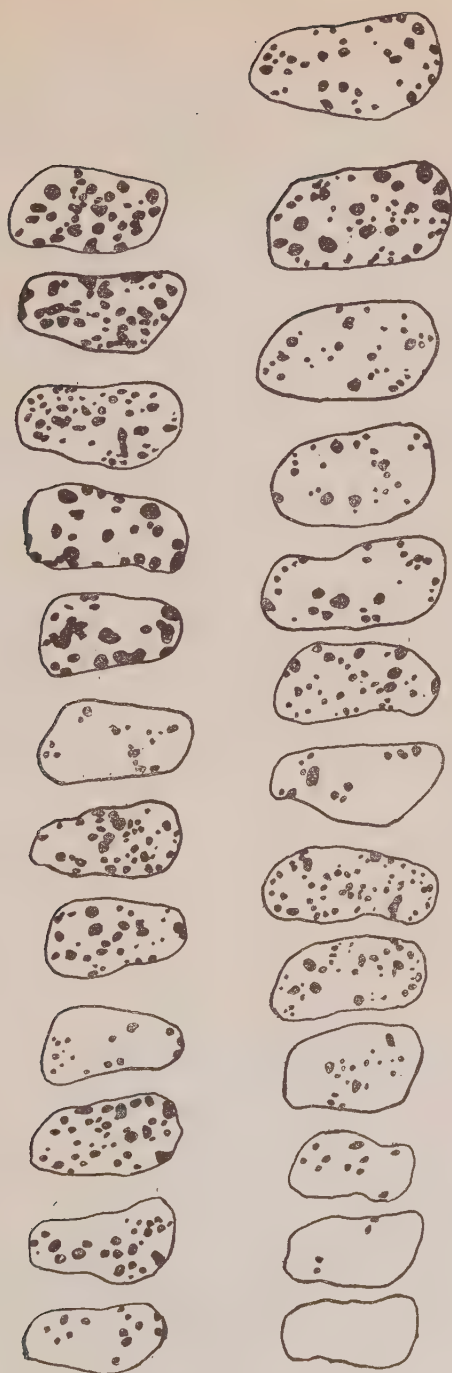


FIG. 3. — Expérience II. A gauche : lot 4, régime SMC + 2 milligrammes d'acide ascorbique. A droite : lot 2, régime d'hiver + 2 milligrammes d'acide ascorbique.

autre mécanisme, comme on pouvait d'ailleurs le prévoir, car leurs meilleurs résultats ont été obtenus lorsque l'antigène et l'acide ascorbique étaient mélangés et injectés en une seule fois.

En ce qui concerne la sensibilité à la tuberculine, nous constatons que ce ne sont pas les cobayes les mieux pourvus en vitamine C qui ont donné les réactions les plus intenses ; ce fait demanderait à être confirmé. Birkhaug [32] a déjà signalé que l'hypervitaminose C atténue nettement les réactions tuberculiniques. Dans un ordre d'idées voisin, Bie-ling [33], Steinbach et Klein [34], Birkhaug [32] ont aussi signalé que l'acide ascorbique augmente la tolérance du cobaye tuberculeux à des doses sûrement mortelles de tuberculine. Il semble bien que cette vitamine puisse jouer dans l'organisme un rôle antitoxique qui est à rapprocher de l'atténuation des phénomènes anaphylactiques et allergiques qu'ont bien montré A. et P. Giroud [35], Nitzulesco [36], Yoshikawa [37] ou de celle de la toxine diphtérique, signalée *in vitro* par Greewald et Harde [38] et *in vivo* par Jungeblut et Zwemer [39].

L'absence de vitamine C entraîne des troubles organiques à la fois plus précoces et plus graves qu'on ne le pense généralement. Dès les tout premiers jours de carence on peut mettre en évidence des lésions anatomiques frappant les cellules (rétraction des dendrites des odontoblastes). De telles lésions sont déjà, comme le fait remarquer Szent-Györgyi, des lésions évoluées et tardives. Le mécanisme d'action de l'acide ascorbique nous échappe encore complètement. L'intervention de ce corps a été mise en évidence dans tant d'activités de l'organisme, que nous ne pouvons dire s'il faut faire entrer en ligne de compte ses propriétés oxydo-réductrices, antitoxiques, l'augmentation du glycogène hépatique, des estérases et des lipases du sang (hypothèse défendue par von Pantschenko-Jurewicz et Kraut [40], et par Scholz [41]), ou encore les modifications hématologiques étudiées par Radford, de Savitsch et Sweany [42], Birkhaug [43], ou des modifications histologiques au niveau des tubercules. Pour Birkhaug [43], les lésions évolueraient plutôt vers la caséification chez les animaux carencés et vers la fibrose chez ceux qui sont hypervitaminés. L'action directe de l'acide ascorbique sur les bacilles paraît

improbable, d'ailleurs il jouerait un rôle favorisant sur les cultures (Leitner [44], Carvalho et Vidal [45]). Signalons enfin que d'après Torrutti et Walhoff [46] la consommation élevée de vitamine C par l'organisme tuberculeux, serait due à une accumulation de ce corps dans les cellules épithélioïdes, et serait en liaison intime avec l'appareil de Golgi.

En résumé, de cette seconde expérience, trois points principaux sont à retenir : l'action aggravante de la carence en vitamine C, l'excellente action de l'acide ascorbique donné à faibles doses aux animaux carencés, et enfin l'importance du facteur alimentaire sur la tuberculose expérimentale. Des lésions aussi dissemblables que celles que nous avons décrites ne pourraient être obtenues, chez des cobayes nourris à un même régime, qu'en leur injectant des doses de bacilles extrêmement différentes. Il résulte de là que l'on peut expliquer par l'action du régime une partie des résultats discordants obtenus par des auteurs travaillant dans des laboratoires différents. Pour certaines expériences tout au moins, il serait souhaitable de préciser les conditions de l'alimentation des animaux. Il y aurait évidemment grand avantage à ce que celle-ci puisse rester identique à elle-même pendant toute l'année.

Dans cette expérience, nous n'avons pu voir si l'action favorable apportée par la substitution du chou à la betterave peut être intégralement mise à l'actif de l'acide ascorbique dont ce légume est riche. Les animaux qui en ont bénéficié ont en effet reçu une quantité de ce corps supérieure aux autres lots, car on peut l'évaluer à 50 milligrammes par jour et par cobaye. Aussi pouvions-nous nous demander si l'acide ascorbique, sous sa forme chimique, et à des doses assurant la saturation des tissus, aurait la même action favorable.

EXPÉRIENCE III. — Les lots suivants ont été constitués :

	COBAYES
	--
1. Régime SMC + 1 milligr. 5 d'acide ascorbique par la bouche.	12
2. Régime SMC + 20 milligrammes d'acide ascorbique par la bouche pendant douze jours, puis 40 milligrammes par injection sous la peau jusqu'à la fin . . . . .	6
3. Régime SMC . . . . .	4

Le régime a été commencé cinq jours au moins avant la date de

l'inoculation virulente. Celle-ci a été faite, de même que dans les expériences précédentes, par l'injection sous la peau de la cuisse de 0 milligr. 001, essoré et pesé, de la souche bovine Chev. I, culture sur pomme de terre glycinée, âgée de seize jours.

Les cobayes du lot 3 moururent de scorbut du trente-deuxième au trente-huitième jour. Tous les autres animaux furent sacrifiés au cinquante et unième jour. Ils présentaient les lésions suivantes :

Lot 1 (régime S M C + 1 milligr. 5 d'acide ascorbique). 10 survivants. — Les ganglions sont de la taille d'un pois, les lésions de la rate sont nombreuses, sauf pour l'une qui n'a que 4 tubercules. Au niveau du foie il y a toujours un début de lésions. Les poumons sont indemnes.

Lot 2 (régime S M C + 20-40 milligrammes d'acide ascorbique). 4 survivants. — Les ganglions sont aussi gros que pour le lot précédent. Les rates sont hypertrophiées, trois présentent de nombreux tubercules ; la quatrième n'en compte qu'une douzaine. 2 cobayes n'ont aucune lésion au foie, les autres en ont d'assez nombreuses. Aucun n'a de tubercules sur les poumons.

Cette dernière expérience nous montre (fig. 4) que l'adjonction de 1 milligr. 5 d'acide ascorbique au régime S M C a permis d'obtenir des lésions sensiblement identiques à celles que donne le régime d'hiver. D'autre part, nous voyons que chez des animaux mis à un régime de carence, l'injection de fortes doses, assurant la saturation, n'a pas amélioré l'évolution de la tuberculose par rapport à ces témoins, ce qui confirme les travaux de Heise et Martin [47], Heise et Steenken [48], Birkhaug [32], Bruno [49], qui tous nient que des doses fortes aient une action favorable sur le cours de la tuberculose. Ceci ne contredit en rien l'heureux effet des doses faibles sur les animaux carencés.

Dans ces conditions, il nous paraît difficile d'attribuer tout le mérite de l'ingestion des fanes de chou uniquement à leur forte teneur en acide ascorbique. Diverses hypothèses viennent à l'esprit pour expliquer ces résultats.

On peut être conduit à penser que sous sa forme pure, chimique,  $C_6H_8O_6$ , l'acide ascorbique ne constitue pas la totalité de la vitamine antiscorbutique. Szent-Györgyi [50] admet actuellement que cet acide agit dans l'organisme à l'état de liaison avec une protéine, de même par exemple que la lactoflavine. D'ailleurs divers auteurs ont remarqué dans le traitement du scorbut, que le corps chimique n'est pas aussi efficace, du moins dans certains cas, que ne le sont les produits naturels, le jus de citron en particulier. Lund, Trier, Ottsen



et Elmby [51], s'appuyant sur ce fait, ont émis l'hypothèse que l'acide ascorbique ne serait qu'un stade préparatoire de

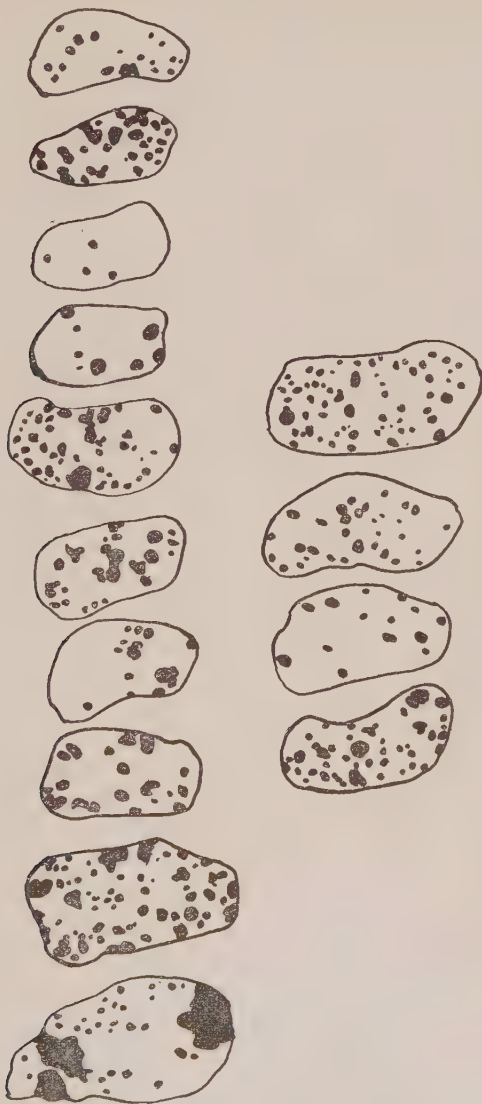


FIG. 4. — Expérience III. A gauche : lot 1, régime SMC + 1 milligr.<sup>5</sup> d'acide ascorbique. A droite : lot 2, régime SMC + 20, puis 40 milligrammes d'acide ascorbique.

la vitamine antiscorbutique vraie et qu'il nécessiterait pour

subir cette transformation l'action d'une covitamine. On ne saurait cependant nier que dans la majorité des cas la forme chimique donne d'aussi bons résultats que la forme naturelle.

Des considérations analogues ont amené Benthath, Rusnyak et Szent-Györgyi [52] à la découverte de la vitamine P (Permeabilitäts-vitamin, qu'il ne faut pas confondre avec la vitamine PP, pellagra-preventive). Elle est étroitement associée à la vitamine C, non seulement par sa présence dans de mêmes végétaux, mais encore par des corrélations d'action. Il est en effet bien établi actuellement que le scorbut, tel qu'on le réalise chez l'animal, est le résultat d'une carence double, C et P. On n'observerait d'avitaminose C pure que dans les cas où le régime apporterait la vitamine P. Bien qu'une carence pure en vitamine P ne paraisse pas avoir de symptômes cliniques, elle modifie notablement l'allure de la maladie lorsqu'elle s'ajoute à une carence en vitamine C. Elle serait en particulier responsable des manifestations hémorragiques et de la fragilité des capillaires. Pour éliminer l'action de ce facteur dans nos expériences, il eût été nécessaire de fournir cette vitamine à l'état pur aux cobayes de nos différents lots, ce que nous n'avons pu faire. Cependant ce que l'on sait de son rôle physiologique nous fait penser qu'on ne peut pas la mettre en cause, car il ne semble pas qu'on lui ait jamais attribué de propriétés anti-infectieuses.

C'est au contraire le cas de la vitamine A, mais nos animaux en recevaient par le régime des quantités suffisantes, ainsi d'ailleurs que des autres « grandes » vitamines.

Pour éliminer la part qui revient à la vitamine C, les expériences faites sur les animaux capables d'en faire la synthèse seraient particulièrement démonstratives. C'est le cas, rapporté par P. Giroud [53], d'un virus de la souris qui existait sous une forme très atténuée dans le cerveau des animaux nourris avec un régime riche en verdure et qui, lorsqu'on supprimait celle-ci, donnait par injection au cobaye une maladie fébrile. Pourtant la souris n'est pas carenable en vitamine C et la modification du régime ne provoquait que l'abaissement insignifiant de 4,5 p. 100 de la teneur des surrénales en acide ascorbique. Malheureusement, et peut-être n'est-ce pas seulement une coïncidence, les animaux non

carencables en vitamine C sont moins sensibles que le cobaye et le singe à la tuberculose. C'est le cas du rat : l'évolution ne se produit qu'après injection de doses massives de bacilles et n'est pas assez régulière pour qu'on puisse se livrer à des comparaisons exactes. Aussi les expériences de Hagedorn [54], qui s'est adressé à cet animal pour étudier l'action de la carence en vitamines A, B, C et D sur la tuberculose, ne sont-elles pas très caractéristiques.

Si les faits que nous rapportons ne peuvent être entièrement expliqués ni par une forme naturelle plus active de l'acide ascorbique, ni par une synergie de cette vitamine avec d'autres déjà connues, on peut être amené à envisager l'existence d'un facteur nouveau, spécifique ou non, qui jouerait un rôle soit directement, soit plutôt par l'intermédiaire de l'organisme, dans la défense contre l'infection tuberculeuse. Un tel facteur, agissant sur une maladie microbienne, ne constituerait pas un fait nouveau. C'est ainsi qu'en 1934 von Euler et Malmberg [55] ont décrit la vitamine J ou C<sub>2</sub> qui jouerait un rôle dans la défense du cobaye contre le pneumocoque. Parmi les fruits riches en acide ascorbique, certains en contiennent (citrons, oranges, cassis, baies de sureau), d'autres en sont dépourvus (paprika, pois, lentilles). Elle résiste à l'action de l'oxygène, ce qui permet de la différencier de l'acide ascorbique qui y est au contraire très sensible.

Du point de vue pratique, s'il est permis de conclure du cobaye à l'homme, nous attirons l'attention sur le caractère extrêmement néfaste de la carence C, carence plus fréquente qu'on ne le pense généralement chez les sujets sains (Yaworsky, Almaden et King [56], A. Giroud [13]), plus fréquente encore et plus grave par ses conséquences chez les tuberculeux. L'apport de quantités élevées de vitamines sous une forme naturelle est sans doute le principal mérite des régimes de Gerson et de Sauerbruch et Hermannsdorfer. Il explique le bénéfice qu'en tirent certaines catégories de tuberculeux.

Les recherches modernes sur les vitamines nous apportent chaque jour des preuves nouvelles de leur variété, et aussi de l'importance qu'elles présentent pour maintenir en bonne santé l'homme et les animaux. Il serait surprenant que ces facteurs dont l'action est si complexe, qui sont si souvent liés

entre eux par des synergies que nous commençons à peine à entrevoir, ne jouent pas un rôle important dans une maladie où l'on a toujours mis en cause la sous-alimentation, la déminéralisation, la décalcification. C'est dans cette voie que nous paraît devoir s'engager l'étude du terrain.

### CONCLUSIONS.

Au point de vue expérimental, le régime alimentaire a une influence manifeste sur l'évolution de la tuberculose inoculée au cobaye.

Le cobaye tuberculeux consomme plus d'acide ascorbique que le cobaye sain.

Les cobayes vivant dans des conditions naturelles, c'est-à-dire pouvant accumuler dans leurs tissus une quantité normale d'acide ascorbique, sont probablement bien moins sensibles à la tuberculose que nous ne le pensons, car nos cobayes de laboratoire sont toujours, sauf exceptions, carencés en vitamine C. Sans doute en est-il de même chez le singe.

Chez les animaux carencés, la tuberculose expérimentale est très aggravée, mais l'administration de faibles doses d'acide ascorbique ralentit son évolution. Les fortes doses ne paraissent pas apporter d'amélioration supplémentaire.

Par contre, l'introduction de fanes de chou dans l'alimentation produit un ralentissement bien plus marqué dans la marche de l'infection tuberculeuse.

On peut se demander dans ce cas si l'acide ascorbique existe sous une forme plus active que la forme chimique, si cette vitamine agit en corrélation avec d'autres, P ou A par exemple, ou s'il faut envisager l'entrée en jeu d'un facteur nouveau plus ou moins spécifique.

### BIBLIOGRAPHIE

- [1] MOURIQUAND. Rapport V<sup>e</sup> Congrès Nat. de la Tuberc., Strasbourg, 1923.
- [2] BRITON et DUCAMP. Rapport V<sup>e</sup> Congrès Nat. de la Tuberc., Strasbourg, 1923.
- [3] MOURIQUAND, MICHEL et BERTOYE. *C. R. Soc. Biol.*, 87, 1922, p. 537.



- [4] COULAUD. *C. R. Congrès de Strasbourg*, 1923, p. 270.
- [5] HAGEDORN. *Zentralbl. ges. Tuberkföschg.*, **34**, 1931, p. 665 et 809.
- [6] PFAFFENBERG. *Zentralbl. ges. Tuberkföschg.*, **51**, 1939, p. 209
- [7] GIROUD (P.). *C. R. Soc. Biol.*, **121**, 1936, p. 714 ; *Bull. Soc. Path. Exot.*, **29**, 1936, p. 372 ; *Bull. mens. Off. Intern. Hyg. Publ.*, **29**, 1937, p. 715.
- [8] LEICHTENTRITT. *Deutsch. med. Woch.*, **40**, 1924, p. 672.
- [9] SHERMAN, LA MER et CAMPBELL. *J. Amer. Chem. Soc.*, **44**, 1922, p. 165.
- [10] MEUNIER. *Ann. Ferment.*, **3**, 1937, p. 156 ; *Bull. Soc. Chim. Biol.*, **49**, 1937, p. 877.
- [11] ZILVA. *Biochem J.*, **30**, 1936, p. 1419.
- [12] GIROUD (A.) et LEBLOND. *La Presse Médicale*, n° 54, 1935.
- [13] GIROUD (A.). *Rev. Méd.*, n° 10, 1938, p. 525. — GIROUD (A.) et RATSIMAMANGA. *La Presse Médicale*, n° 40-41, 1940. — GIROUD (A.), LEBLOND, RATSIMAMANGA et GERO. *Bull. Soc. Chim. Biol.*, **20**, 1938, p. 1079 et 1088. — GIROUD (A.), RATSIMAMANGA, RABINOWICZ et HARTMANN. *La Presse Médicale*, n° 99, 1937.
- [14] SZENT-GYÖRGYI. *La Presse Médicale*, n° 51, 1938, p. 995.
- [15] GIROUD (A.) et RATSIMAMANGA. *Arch. Hosp.*, n° 15, 1939, p. 891.
- [16] SCHROEDER. *Klin. Woch.*, **14**, 1935, p. 484.
- [17] HARDE, ROTHSTEIN et RATISCH. *Proc. Soc. exp. Biol. and Med.*, **32**, 1935, p. 1088.
- [18] ABBASY, HARRIS et MARRACK. *Lancet*, **2**, 1935, p. 1399.
- [19] DEGELLER. *Acta brev. neerl. phys. pharm. microb.*, **6**, 1936, p. 64.
- [20] WRIGHT. *Amer. Journ. med. Sc.*, **192**, 1936, p. 719.
- [21] HASSELBACH. — *Deutsch. med. Woch.*, **62**, 1936, p. 49 ; *Zeitschr. f. Tuberk.*, **75**, p. 336.
- [22] SZENT-GYÖRGYI. *J. Amer. med. Ass.*, **109**, 1937, p. 1912.
- [23] BURKHARDT et WEISER. *Schweiz. med. Woch.*, **66**, 1936, p. 832.
- [24] GOGGA et SCHOLZ. *Zeitschr. f. Tuberk.*, **78**, 1937, p. 233.
- [25] JETTER et BUMBALO. *Amer. J. med. Sc.*, **195**, 1938, p. 362.
- [26] SCARINCI et MEA. *Ann. Inst. Carlo Forlanini*, **2**, 1938, p. 653.
- [27] ARMAND-DELILLE et URBAIN. *C. R. Soc. Biol.*, **127**, 1938, p. 522.
- [28] WEBER. *Wien. klin. Woch.*, 1938, p. 1191.
- [29] MARCOUX. *Laval méd.*, **4**, 1939, p. 74.
- [30] GREENE, STEINER et KRAMER. *Amer. Rev. Tuberc.*, **33**, 1936, p. 585.
- [31] MADISON et MANWARING. *Proc. Soc. exp. Biol. and Med.*, **37**, 1937, p. 402.
- [32] BIRKHAUG. *Acta tuberc. scand.*, **12**, 1938, p. 89.
- [33] BIELING. *Zeitschr. f. Hyg.*, **101**, 1924, p. 442.
- [34] STEINBACH et KLEIN. *Proc. Soc. exp. Biol. and Med.*, **35**, 1936, p. 151.
- [35] GIROUD (P. et A.). *C. R. Soc. Biol.*, **121**, 1936, p. 1588 ; **122**, 1936, p. 537. — GIROUD (P. et A.), RATSIMAMANGA et RABINOWICZ. *C. R. Soc. Biol.*, **123**, 1936, p. 1146.
- [36] NITZULESCO. *Romania. med.*, **65**, 1938.
- [37] YOSHIKAWA. *Nagasaki Igakkai Zassi*, **48**, 1939, p. 141.
- [38] GREEWALD et HARDE. *Proc. Soc. exp. Biol. and Med.*, **32**, 1935, p. 1157.
- [39] JUNGEBLUT et ZWEMER. *Proc. Soc. exp. Biol. and Med.*, **32**, 1935, p. 1229.

- [40] VON PANTSCHENKO-JUREWICZ et KRAUT. *Biochem. Zeitschr.*, **275**, p. 114 et **285** p. 407.
- [41] SCHOLZ. *Deutsch. med. Woch.*, 1938, p. 374
- [42] RADFORD, DE SAVITSCH et SWEANY. *Amer. Rev. Tuberc.*, **35**, 1937, p. 784.
- [43] BIRKHAUG. *Acad. Sc.*, Oslo, 28 octobre 1938.
- [44] LEITNER. *Klin. Woch.*, **16**, 1937, p. 1423.
- [45] CARVALHO et VIDAL. *C. R. Soc. Biol.*, **129**, 1938, p. 687.
- [46] TORUTTI et WALHOFF. *Klin. Woch.*, 1938, p. 855.
- [47] HEISE et MARTIN. *Proc. Soc. exp. Biol. and Med.*, **35**, 1936, p. 337.
- [48] HEISE et STEENKEN. *Amer. Rev. Tuberc.*, **39**, 1939, p. 794.
- [49] BRUNO. *Riv. Path. e Clin. Tuberc.*, **12**.
- [50] SZENT-GYÖRGYI. Rapport au VI<sup>e</sup> Conseil de Chimie Solvay.
- [51] LUND, TRIER, OTTSEN et ELMBY. *Klin. Woch.*, **18**, 1939, p. 79-80.
- [52] BENTHATH, RUSNYACK et SZENT-GYÖRGYI. *Nature*, **139**, 1937, p. 326.
- [53] GIROUD (P.). *C. R. Soc. Biol.*, **123**, 1936, p. 862.
- [54] HAGEDORN. *Beitr. z. Klin. d. Tuberk.*, **70**, 1928, p. 389 et **72**, p. 1.
- [55] VON EULER et MALMBERG. *Naturwiss.*, **22**, 1934, p. 205. — VON EULER, SÖDER et MALMBERG. *Zeitschr. f. Hyg.*, **116**, 1935, p. 672-682.
- [56] YAWORSKY, ALMADEN et KING. *J. Biol. Chem.*, **106**, 1934, p. 525.

# CONTRIBUTION A L'ÉTUDE DE QUELQUES COMPOSÉS GRAS DES BACILLES ACIDO-RÉSISTANTS

par R. O. PRUDHOMME.

(*Institut Pasteur, Service de M. le Professeur Marchoux.*)

Si le bacille de la lèpre est le premier des germes pathogènes pour l'homme qui ait été découvert, on connaît peu, jusqu'à maintenant, les propriétés biologiques ou biochimiques qu'il possède, évidemment parce que l'étude en est rendue plus difficile du fait qu'on ne dispose d'aucune méthode de culture. Doit-on le rapprocher des bacilles tuberculeux, des bacilles paratuberculeux, du bacille de la lèpre murine ou l'en séparer ? Nous avons pensé qu'il était peut-être possible, par l'étude comparée des composés gras des bacilles acido-résistants d'éclairer cette question, quoique déjà de nombreux auteurs, notamment A. Berthelot et M<sup>lle</sup> G. Amoureux [1], F. B. Cooper [2] et E. Chargaff soit seul [3], soit avec J. Dieryck [4] aient étudié la composition chimique et les constantes des graisses et des cires des bacilles tuberculeux et paratuberculeux. C'est dans ce but que nous avons étudié les graisses et les cires de différentes souches d'acido-résistants aux points de vue de l'indice d'iode, de l'indice de saponification et de l'absorption dans l'ultra-violet. Nous devons à l'obligeance de M. Boquet, que nous sommes heureux de remercier ici, les souches de B. tuberculeux et quelques B. pseudo-tuberculeux.

## 1° Extraction des Composés gras.

Nous avons préparé une vingtaine de ballons de milieu de Sauton ajusté à pH 7,2 pour chaque souche étudiée. Voici les bacilles que nous avons choisis :

- B. tuberculeux humain souche « Ostéite ».
- B. tuberculeux bovin souche « Vallée ».
- B. tuberculeux aviaire souche « Dinde ».
- B. Calmette-Guérin (BCG).
- B. de la Fléole.
- B. de Lleras.
- B. de Kedrowsky.

Remarquons que ces deux derniers bacilles isolés d'hanséniens avaient été considérés à tort, respectivement par Lleras [5] et par Kedrowsky [6], comme bacilles lépreux. Notons aussi que, d'après les travaux de Saenz [7], le bacille de Lleras est un paratuberculeux analogue aux bacilles des robinets.

Ne possédant pas de culture du bacille de Hansen [8], nous avons été obligé de nous servir de bacilles retirés des lépromes. Nous nous sommes adressé au bacille de la lèpre du rat ou bacille de Stéfansky, à cause de la facilité avec laquelle on peut se le procurer. On obtient à partir de ces lépromes une émulsion très riche en bacilles, débarrassée de tous débris tissulaires, par une méthode qui a été décrite dans un travail antérieur [9].

Au bout d'un mois pour les 3 premières souches qui cultivent rapidement et de deux mois et demi pour les 2 dernières qui poussent plus lentement, nous avons récolté les bacilles sur papier filtre ordinaire.

Les bacilles ainsi recueillis et les bacilles de Stéfansky obtenus par centrifugation d'une émulsion pure provenant de plusieurs lépromes, sont traités par une méthode analogue à celle employée par Anderson [10].

#### A. — EXTRACTION DES GRAISSES ET DES PHOSPHATIDES.

Les bacilles recueillis sur le filtre sont abondamment lavés à l'eau distillée. Une fois essorés, on les pèse et on les plonge dans un mélange à parties égales d'éther et d'alcool à 90°. Au bout de quinze jours, on remplace le mélange par un mélange neuf. On continue ainsi jusqu'à ce qu'un peu de solvant évaporé sur une lame de verre ne laisse plus de résidu appréciable. Toutes ces liqueurs sont réunies et évaporées dans le vide sous courant d'azote débarrassé de toutes traces d'oxygène, à une température n'excédant pas 40°. On obtient ainsi une substance d'apparence grasse, possédant une odeur spéciale, colorée en jaune brun pour la souche Vallée, la souche Dinde, le bacille de la fléole, celui de Lleras et blanche pour le BCG, la souche Ostéite, le bacille de Stéfansky et celui de Kedrowsky. Cet extrait est composé de polyosides, de graisses neutres et acides gras et de phosphatides.

On reprend par l'eau et par l'éther en agitant fortement. La substance se dissout entièrement. On laisse décanter l'émulsion ainsi formée et on recueille séparément la solution aqueuse (polyosides) et la solution éthérée (phosphatides et graisses neutres et acides gras). On obtient rarement une décantation nette; on est généralement obligé de centrifuger.



La solution éthérée est desséchée sur du sulfate de sodium anhydre, puis évaporée à sec dans le vide sous azote, en ayant toujours soin de ne pas dépasser la température de 40°. L'extrait ainsi obtenu est agité avec de l'acétone sèche qui en dissout une partie. La solution acétonique évaporée avec les mêmes précautions que précédemment donne les graisses neutres et acides gras. L'autre partie, insoluble dans l'acétone, soluble dans l'éther contient les phosphatides. (Ces dénominations sont celles adoptées par Anderson.)

## B. — EXTRACTION DES CIRES.

Les bacilles ainsi traités par le mélange alcool-éther sont mis à macérer dans du chloroforme que l'on renouvelle tous les huit jours, jusqu'à ce que le solvant n'extraie plus rien. Evaporé avec les précautions habituelles, ce chloroforme abandonne les cires.

## 2° Technique des mesures.

Nous avons étudié sur ces différentes fractions :

### A. — L'INDICE D'IODE.

La mesure de l'indice d'iode a été faite par la microméthode de Rosemund et Kuhnenn [41] modifiée par Yasuda [42].

Pour cela, on met dans une petite fiole conique une solution chloroformique des lipides à étudier. Cette solution refroidie dans la glace est additionnée de 2 cent. cubes (mesurés exactement) de dibromopyridine (1). On bouche la fiole et on l'abandonne pendant quinze minutes à la température du laboratoire, en ayant soin de la laisser à

(1) Préparation de la dibromopyridine. On prépare les deux solutions suivantes :

A. Pyridine purifiée . . . . .	16 c.c. 5
Acide acétique glacial . . . . .	40 cent. cubes.
B. Acide sulfurique concentré pur . . . . .	10 c.c. 9
Acide acétique glacial . . . . .	40 cent. cubes.

On mélange les deux solutions en versant la solution B dans la solution A, plongée dans la glace et quand la combinaison est faite on ajoute le mélange :

Brome . . . . .	5 cent. cubes.
Acide acétique glacial . . . . .	40 cent. cubes.

En portant à 4 litres avec de l'acide acétique glacial, on a une solution sensiblement 0,05 N que l'on titre au moment de l'emploi.

l'obscurité et en l'agitant de temps en temps. Au bout de ce délai, on ajoute 0 c. c. 5 d'une solution à 10 p. 100 d'iodure de potassium et on titre l'iode libéré par le brome non fixé sur les doubles liaisons par une solution 0,02 N d'hyposulfite de sodium, soit  $n$  cent. cube. Un dosage témoin mené parallèlement sur 2 cent. cubes (mesurés exactement) de dibromopyridine dissoute dans le chloroforme donne  $N$  cent. cube. L'indice d'iode est donné par la formule :

$$I = 254 \frac{N - n}{p}$$

$p$  étant le poids des lipides en milligrammes contenus dans la prise d'essai.

Nos dosages ont été faits plusieurs fois et en double.

#### B. — L'INDICE DE SAPONIFICATION.

La mesure de l'indice de saponification a été exécutée par la méthode ordinaire. Cette méthode décrite dans tous les traités de chimie biologique est très simple, mais demande des quantités déjà importantes de matière. Ne possédant que de faibles portions de lipides et devant répéter les dosages, nous avons opéré comme il suit :

On numérote à l'aide d'un diamant une série d'ampoules de 5 cent. cubes. On les tare. Les lipides à étudier sont dissous dans un solvant convenable de façon à avoir de 20 à 30 milligrammes de matière par centimètre cube. On évapore à sec les ampoules. On les pèse à nouveau, ce qui donne le poids exact des lipides mis en jeu. Avec une micro-burette de précision, on met dans chaque ampoule exactement 1 cent. cube de potasse alcoolique à peu près normale. On scelle les ampoules. On prépare de même deux ampoules témoins, qui ne contiennent que 1 cent. cube de potasse alcoolique. Toutes les ampoules sont portées dans un bain-marie bouillant pendant trente minutes (des essais préliminaires faits en fonction du temps, nous ont montré qu'après trente minutes l'hydrolyse de ces substances ne pouvait pas être plus poussée). Au bout de ce temps, on retire les ampoules et on les laisse refroidir. On donne alors plusieurs coups de lime sur la surface de l'ampoule dont on va doser le contenu. On la laisse tomber au fond d'une fiole conique et on la brise avec un agitateur, ce qui est facile grâce aux morsures faites par l'acier. On ajoute un peu d'eau distillée, on rince l'agitateur, on agite fortement et on titre la potasse qui n'a pas été employée par l'hydrolyse avec de l'acide sulfurique  $N/20$  en présence de phénolphthaléine. Soit  $N$  cent. cube la quantité d'acide trouvée pour une ampoule témoin et  $n$  cent. cube la quantité trouvée pour une

ampoule contenant des lipides, l'indice de saponification de ces lipides sera :

$$S = \frac{2,8(N-n)}{p}$$

$p$  étant le poids des lipides en grammes.

#### C. — LE SPECTRE D'ABSORPTION DANS L'ULTRA-VIOLET.

Les lipides à étudier sont mis en solution dans un solvant approprié transparent à l'ultra-violet (éther, alcool, chloroforme, cyclohexane, etc.). L'appareil employé est le spectrographe universel de Zeiss avec prisme de Hufner qui permet de photographier en même temps le solvant et la solution sous la même épaisseur. Un secteur tournant sert à réduire dans des proportions bien déterminées l'intensité lumineuse qui tombe sur la cuve contenant le solvant.

La source de lumière ultra-violette est soit un arc au tungstène fonctionnant sous une tension d'environ 10.000 volts, soit une lampe à hydrogène système Chalonge.

Nous avons mesuré le coefficient d'absorption  $\epsilon$  défini par la relation :

$$I = I_0 \cdot 10^{-\epsilon d}$$

dans laquelle :

$I_0$ , Intensité de la lumière qui pénètre dans la solution.

$I$ , Intensité de la lumière qui pénètre dans le solvant.

$d$ , épaisseur du liquide en centimètre cube.

Quand pour une raie déterminée, il y a égalité de noircissement pour la photographie du solvant et celle de la solution sous la même épaisseur, le rapport

$$\frac{I_0}{I} \text{ est égal à } \frac{2\pi}{\alpha},$$

$\alpha$  étant l'angle d'ouverture du secteur tournant.

## 3° Résultats.

## A. — GRAISSES.

Les substances extraites de ces différentes souches par la méthode décrite précédemment sont des corps d'apparence grasseuse, dont le point de fusion est compris entre 35° et 40° ; elles répandent une odeur spéciale qui prend à la gorge quand on les chauffe un peu au-dessus de leur point de fusion. Leur couleur dépend de leur origine : jaunes pour la souche Ostéite, la souche Vallée, le bacille de la fléole, et celui de Lleras ; incolores ou très peu colorées pour la souche Dinde, le BCG, le bacille de Stéfansky et celui de Kedrowsky. Leurs solutions éthérées sont toutes plus ou moins jaunes de même que leurs solutions acétoniques, sauf pour les graisses du bacille de Stéfansky dont la solution acétonique est rose et la solution éthérée jaune.

Les graisses de ce dernier bacille ont aussi la propriété de donner une solution éthérée visqueuse même à de faibles concentrations (1 p. 100). Au bout de quelques semaines, l'éther reprend sa fluidité. On peut remarquer aussi que les graisses du bacille de Stéfansky ont une odeur fade et écœurante qui est l'odeur caractéristique que répandent les instruments qui ont servi à prélever un léprome ou à autopsier un rat lépreux, quand on les fait bouillir. Quand nous aurons à notre disposition un assez grand nombre de lépromes, nous pensons pouvoir isoler ce corps qui doit être au bacille de Stéfansky ce que le mycol est au bacille tuberculeux.

En vérité, les corps que l'on isole par cette méthode sont des mélanges de graisses neutres, d'acides gras libres et d'acools supérieurs.

Voici les moyennes des Indices d'iode et de saponification de ces différentes graisses :

	INDICE d'iode	INDICE de saponification
B. T. Ostéite . . . . .	30	142
B. T. Vallée. . . . .	21,7	143
B. T. Dinde. . . . .	28,1	150
B. T. BCG. . . . .	15,4	131
B. de Stéfansky . . . . .	20,1	199
B. de la Fléole . . . . .	36,2	150
B. de Lleras . . . . .		120
B. de Kedrowsky. . . . .		162



Nous voyons que tous ces indices sont du même ordre de grandeur. L'indice de saponification du bacille de Stéfansky est nettement plus élevé que celui des autres bacilles. Par contre, son indice d'iode le rapproche de la souche Vallée. L'indice des graisses extraites du bacille de Lleras n'a pu être mesuré. En effet la quantité d'hyposulfite de sodium trouvée dans les dosages de l'indice d'iode de ces graisses a été plus grande que celle du témoin. Croyant à une erreur, nous avons répété nos mesures et nous nous sommes aperçu qu'il en était de même chaque fois, comme si la solution chloroformique des graisses de ce bacille avait la propriété de faire dégager l'iode de la solution d'iodure. Effectivement cette solution chloroformique agitée avec une solution aqueuse d'iodure de potassium donne un dégagement d'iode. Il en est de même pour le bacille de Kedrowsky.

Les spectres d'absorption de ces corps en solution éthérée ne présentent rien de remarquable : les courbes se rapprochent sensiblement d'une droite. Seules les graisses extraites de la souche « Dinde » nous ont donné une courbe présentant un maximum et minimum rapprochés. Le maximum se trouve vers  $3.950 \text{ \AA}$  et un minimum vers  $3.800 \text{ \AA}$ . On retrouve cette courbe dans la partie des graisses qui est soluble dans l'alcool, la partie insoluble donnant une droite, ce qui laisse à penser que cette particularité est due à l'absorption par un acide gras.

#### B. — Cires.

Les cires extraites par le chloroforme, après traitement des bacilles au mélange éther-alcool, sont des substances peu ou pas colorées, peu odorantes, fondant entre  $60^\circ$  et  $80^\circ$ . Leur odeur et leur couleur, quand elles en ont, rappellent de loin celles des graisses correspondantes. Leur indice d'iode est faible :

B.T. Ostéite. . . . .	1,7
B.T. Vallée . . . . .	8,7
B.T. « Dinde » . . . . .	5,7
B.T. BCG . . . . .	2,4
B. de la Fléole. . . . .	26,2
B. de Lleras. . . . .	7,2
B. de Kedrowsky . . . . .	4,5

Leur spectre d'absorption en solution éthérée peut être représenté par une droite qui n'offre rien de remarquable. Alors qu'à ce point de vue les graisses du bacille aviaire souche « Dinde » se distinguent des autres, les cires de cette souche présentent une absorption dans l'ultra-violet comparable à celle des cires des autres souches (1).

#### C. — AUTRES EXTRACTIONS.

En examinant les résultats, on voit que l'on trouve peu de différences entre les diverses souches de bacilles acido-résistants. C'est pourquoi nous avons voulu savoir si d'autres extractions ne se montreraient pas plus fertiles en résultats.

Dans ce but, les bacilles déjà traités au mélange alcool-éther et au chloroforme ont été mis à macérer dans de l'acétone sèche renouvelée plusieurs fois. Ce solvant extrait à froid peu de substances. L'acétone étant très peu transparente aux rayons ultra-violets, les spectres de ces substances ont été faits en solutions éthérées. Tous ces corps se caractérisent aussi par des droites.

Nous avons fait alors agir l'acétone bouillant sur les bacilles. Ceux-ci, placés dans la cartouche d'un Kumagawa, ont été extraits pendant deux heures. Cette extraction se montre plus riche que celle faite à froid, mais les corps obtenus ne montrent non plus rien de remarquable dans leurs spectres d'absorption.

Les phosphatides obtenus au cours de la préparation des graisses se montrent très opaques aux rayons ultra-violets. Les spectres doivent être faits sur des solutions très étendues. Leurs spectres d'absorption sont aussi représentés par des droites.

On voit qu'on ne peut pas différencier nettement les bacilles acido-résistants uniquement par l'indice d'iode, l'indice de saponification ou le spectre d'absorption de certains de leurs composés gras. Si, pris isolément, ces renseignements ne peuvent suffire à caractériser un bacille, l'ensemble de ces données peut servir à leur identification.

(1) En raison des événements, nous n'avons malheureusement pas pu étudier les cires du bacille de Stéfansky.

### Conclusions.

1° Les graisses des bacilles acido-résistants tuberculeux ou paratuberculeux ont des indices d'iode faibles qui varient dans des limites assez étroites entre 15 et 36. Le bacille de Stéfansky a un indice d'iode égal à 20, en quoi il se rapproche du bacille tuberculeux bovin souche « Vallée ».

2° Les indices de saponification de ces graisses oscillent entre 130 et 200. Ce sont les graisses du bacille de Stéfansky qui possèdent l'indice le plus élevé. Il est égal à 199.

3° Les graisses du bacille de Stéfansky rendent l'éther visqueux quand on les y dissout.

4° Les cires extraites des bacilles acido-résistants ont un indice d'iode très faible compris entre 1,7 et 7. Seules les cires du bacille de la fléole ont un indice plus élevé qui est égal à 26,2.

5° Les spectres d'absorption des graisses, des cires et des phosphatides bacillaires ne présentent rien de remarquable. Leurs courbes d'absorption se rapprochent d'une droite. Seules les graisses extraites de la souche aviaire « Dinde » donnent une courbe présentant un maximum à  $3.950 \text{ \AA}$  et un minimum à  $2.800 \text{ \AA}$ . Les phosphatides se montrent très opaques aux rayons ultra-violets.

6° Les extraits à l'acétone à froid ou à chaud ne possèdent pas non plus de caractères différentiels bien nets.

7° Si aucune des données ci-dessus énumérées ne suffit à elle seule pour déterminer l'espèce des mycobactéries examinées, il ressort de nos recherches que l'association de deux d'entre elles les classe avec autant de précision que peuvent le faire les méthodes biologiques couramment employées.

### BIBLIOGRAPHIE

- [1] BERTHELOT (A.) et M<sup>lle</sup> AMOUREUX (G.). *Ces Annales*, **42** ; Suppl. 1928, p. 107.
- [2] COOPER (F. B.). *J. Biol. Chem.*, **88**, 1930, p. 485.
- [3] CHARGAFF (E.). *Zeitschr. f. Biol. Chem.*, **201**, 1931, p. 198 et **217**, 1933, p. 115.

- [4] CHARGAFF (E.) et DIERYCK (J.). *Biochem. Zeitschr.*, **255**, 1932, p. 319.
- [5] LLERAS (A. F.). *Rev. Facultad Médic.*, **4**, n° 12, 1933.
- [6] KEDROWSKY. *III<sup>e</sup> Congrès international de la Lèpre*. Paris, 1924, Baillière, édit.
- [7] SAENZ (A.). *Bull. Acad. Méd.*, **119**, 1938, p. 579.
- [8] MARCHOUX (E.) et CHORINE (V.). *Rev. Derm. et Vénér.*, juin 1933, p. 1.
- [9] PRUDHOMME (R. O.). *Bull. Soc. Path. Exot.*, **12**, 1939, p. 136.
- [10] ANDERSON (R. J.). *Physiol. Rev.*, **12**, 1932, p. 166.
- [11] ROSEMUND (K. W.) et KUHNHENN (W.). *Zeitschr. f. Untersuch. der Nahrungs und Genussmittel*, **46**, II, 1923, p. 154.
- [12] YASUDA. *Biol. Chem.*, **94**, 1931, p. 401.

## LES VACCINATIONS ANTIRABIKES A L'INSTITUT PASTEUR EN 1940

par L. CRUVEILHIER et Ch. VIALA.

Ce rapport, établi suivant le plan fixé par la Conférence internationale de la rage, concerne l'année 1940.

### 1° *Personnes traitées :*

1.496 personnes se sont présentées à la consultation du Service des Vaccinations Antirabiques. Chez 449 le traitement a été jugé nécessaire.

### 2° *Méthode de traitement :*

La méthode employée est la méthode pastorienne.

Les moelles sont soumises à la dessiccation, en chambre noire à 22°, dans des flacons munis de deux tubulures fermées par de l'ouate ordinaire dont le fond est garni de potasse caustique. Après deux, trois ou quatre jours de dessiccation, les moelles sont introduites dans des pots-bans contenant 20 cent. cubes de glycérine neutre à 30° Baumé et préalablement stérilisés à l'autoclave à 120°.

Ce procédé de conservation des moelles en glycérine, proposé par E. Roux en 1887 (1) et introduit dans la pratique par A. Calmette en 1891, est adopté depuis 1911 à l'Institut Pasteur.

Les moelles ainsi traitées sont conservées à la glacière à + 3°. Elles ne sont plus utilisées pour la vaccination lorsqu'elles ont séjourné dix jours en glycérine.

Chaque jour, les sujets en traitement reçoivent 4 à 5 *millimètres* de moelle triturée dans 3 cent. cubes d'eau physiologique. Le traitement a une durée de quinze, dix-huit, vingt et un ou vingt-cinq jours, suivant la gravité des morsures.

1. E. ROUX. Ces *Annales*, 4, 1887, p. 87.



\*  
\* \*

Le virus fixe, actuellement utilisé, représentait, le 31 décembre 1940, le 1.670<sup>e</sup> passage de la souche employée lors de la création du service des vaccinations antirabiques rue d'Ulm.

Afin d'éviter l'infection possible des moelles, celles-ci sont extraites avant la mort des animaux qui sont saignés dès que la paralysie est complète.

Le procédé d'extraction des moelles est celui décrit par Oshida.

\*  
\* \*

### Formule du traitement d'après l'âge des moelles.

1 <sup>er</sup> jour . . . . .	Moelle de 4 jours (3 cent. cubes).
2 <sup>e</sup> — . . . . .	— 4 — —
3 <sup>e</sup> — . . . . .	— 4 — —
4 <sup>e</sup> — . . . . .	— 4 — —
5 <sup>e</sup> — . . . . .	— 3 — —
6 <sup>e</sup> — . . . . .	— 3 — —
7 <sup>e</sup> — . . . . .	— 4 — —
8 <sup>e</sup> — . . . . .	— 3 — —
9 <sup>e</sup> — . . . . .	— 2 — —
10 <sup>e</sup> — . . . . .	— 3 — —
11 <sup>e</sup> — . . . . .	— 3 — —
12 <sup>e</sup> — . . . . .	— 2 — —
13 <sup>e</sup> — . . . . .	— 3 — —
14 <sup>e</sup> — . . . . .	— 3 — —
15 <sup>e</sup> — . . . . .	— 2 — —
16 <sup>e</sup> jour . . . . .	Moelle de 3 jours (3 cent. cubes).
17 <sup>e</sup> — . . . . .	— 3 — —
18 <sup>e</sup> — . . . . .	— 2 — —
19 <sup>e</sup> jour . . . . .	Moelle de 3 jours (3 cent. cubes).
20 <sup>e</sup> — . . . . .	— 2 — —
21 <sup>e</sup> — . . . . .	— 2 — —
22 <sup>e</sup> jour . . . . .	Moelle de 2 jours (3 cent. cubes).
23 <sup>e</sup> — . . . . .	— 2 — —
24 <sup>e</sup> — . . . . .	— 2 — —
25 <sup>e</sup> — . . . . .	— 2 — —

### 3<sup>o</sup> Répartition des personnes traitées d'après le territoire sur lequel elles ont été mordues :

France. . . . . 449

4° Répartition des personnes traitées suivant l'animal :  
mordeur :

Chiens de propriétaires connus. . . . .	106
Chiens errants . . . . .	254
Chats de propriétaires connus . . . . .	35
Chats errants. . . . .	43
Rats . . . . .	10
Autres animaux . . . . .	1

5° Répartition des personnes traitées d'après les preuves de  
rage chez l'animal mordeur :

*Catégorie A.* — La rage de l'animal mordeur a été constatée par le développement de la maladie chez des animaux inoculés avec le bulbe ou par un examen histologique.

*Catégorie B.* — La rage de l'animal mordeur a été constatée par examen vétérinaire.

*Catégorie C.* — L'animal mordeur est suspect de rage.

Catégorie A . . . . .	0
Catégorie B. . . . .	8
Catégorie C. . . . .	441

Pour 12 personnes de cette dernière catégorie, l'examen histologique des ganglions plexiformes des animaux mordeurs a révélé une infiltration cellulaire identique à celle observée au premier stade de la rage (2).

6° Répartition des personnes traitées d'après les caractères  
des morsures :

Profondes . . . . .	396
Superficielles. . . . .	53

7° Répartition des personnes traitées suivant que les vête-  
ments ont été interposés ou non.

Peau nue. . . . .	289
Vêtements interposés. . . . .	160

8° Répartition des personnes traitées d'après le siège de la  
morsure (3) :

(2) Les examens histologiques ont été parfois effectués par le Laboratoire National des Recherches Vétérinaires d'Alfort.

(3) Quand il s'agit de morsures multiples, seul est indiqué le siège de la morsure la plus dangereuse.

Tête . . . . .	37
Membres supérieurs . . . . .	279
Tronc . . . . .	1
Membres inférieurs . . . . .	132

9° Répartition des personnes traitées d'après le nombre de jours écoulés entre la morsure et le traitement :

0 à 4 jours . . . . .	255
5 à 7 jours . . . . .	95
8 à 14 jours . . . . .	63
15 à 21 jours . . . . .	18
Plus de 21 jours . . . . .	18

#### 10° Autres renseignements :

##### Répartition par départements des personnes traitées à l'Institut Pasteur.

Aude . . . . .	1	Morbihan . . . . .	2
Aveyron . . . . .	1	Nièvre . . . . .	3
Charente . . . . .	2	Oise . . . . .	2
Corrèze . . . . .	2	Orne . . . . .	1
Côtes-du-Nord . . . . .	3	Puy-de-Dôme . . . . .	1
Dordogne . . . . .	2	Saône-et-Loire . . . . .	1
Eure . . . . .	1	Sarthe . . . . .	2
Eure-et-Loir . . . . .	1	Seine { Paris . . . . .	160
Finistère . . . . .	1	{ Banlieue . . . . .	82
Ille-et-Vilaine . . . . .	10	Seine-Inférieure . . . . .	5
Indre-et-Loire . . . . .	1	Seine-et-Marne . . . . .	4
Isère . . . . .	1	Seine-et-Oise . . . . .	47
Loir-et-Cher . . . . .	1	Sèvres (Deux-) . . . . .	1
Loiret . . . . .	4	Somme . . . . .	1
Maine-et-Loire . . . . .	1	Vosges . . . . .	1
Manche . . . . .	3	Yonne . . . . .	4
Marne . . . . .	3		
Meuse . . . . .	1		356

A ces 356 personnes mordues réparties par départements, s'ajoutent 93 soldats traités pendant la période s'écoulant de janvier à juin et appartenant pour la plupart à la zone des armées. Nous avons continué à déterminer, en vue de transfusions possibles, le groupement sanguin des soldats en traitement grâce au concours qui nous a été donné par MM. Dujarric de la Rivière et Kossovitch.

##### Répartition par mois des personnes traitées.

Janvier . . . . .	29	Juillet . . . . .	57
Février . . . . .	13	Août . . . . .	32
Mars . . . . .	42	Septembre . . . . .	14
Avril . . . . .	34	Octobre . . . . .	19
Mai . . . . .	49	Novembre . . . . .	12
Juin . . . . .	102	Décembre . . . . .	16

Le tableau ci-dessous indique les résultats généraux des vaccinations depuis l'origine.

ANNÉES	PERSONNES traitées	CATÉGORIE A	CATÉGORIE B	CATÉGORIE C	DÉCÈS	MORTALITÉ p. 100
1886 . . . . .	2 671	231	1.926	514	25	0,94
1887 . . . . .	1.770	357	1.156	257	14	0,79
1888 . . . . .	1.622	402	972	255	9	0,55
1889 . . . . .	1.830	346	1.187	297	7	0,38
1890 . . . . .	1.540	416	900	215	5	0,32
1891 . . . . .	1.559	324	915	320	4	0,25
1892 . . . . .	1.790	128	1.062	600	4	0,22
1893 . . . . .	1.648	132	1.008	508	6	0,36
1894 . . . . .	1.384	166	798	423	7	0,50
1895 . . . . .	1.520	122	949	449	5	0,38
1896 . . . . .	1.308	106	747	455	4	0,30
1897 . . . . .	1.529	150	918	461	6	0,39
1898 . . . . .	1.465	141	855	469	3	0,20
1899 . . . . .	1.614	152	1.099	363	4	0,25
1900 . . . . .	1.420	179	866	375	4	0,28
1901 . . . . .	1.321	174	785	362	5	0,38
1902 . . . . .	1.105	150	625	330	2	0,18
1903 . . . . .	628	116	224	288	2	0,32
1904 . . . . .	755	148	330	271	3	0,39
1905 . . . . .	727	166	306	255	3	0,41
1906 . . . . .	772	173	396	203	1	0,13
1907 . . . . .	786	135	384	267	3	0,38
1908 . . . . .	524	113	269	142	1	0,19
1909 . . . . .	467	84	210	173	1	0,21
1910 . . . . .	401	98	143	160	0	0,00
1911 . . . . .	342	76	114	152	1	0,29
1912 . . . . .	395	71	145	179	0	0,00
1913 . . . . .	330	73	113	144	0	0,00
1914 . . . . .	373	68	102	203	0	0,00
1915 . . . . .	654	87	301	266	1	0,15
1916 . . . . .	1.388	188	658	542	3	0,21
1917 . . . . .	1.543	216	848	479	4	0,26
1918 . . . . .	1.803	206	885	712	3	0,16
1919 . . . . .	1.813	231	920	662	3	0,16
1920 . . . . .	1.126	86	554	486	6	0,53
1921 . . . . .	998	64	412	522	1	0,10
1922 . . . . .	754	101	353	300	0	0,00
1923 . . . . .	727	90	363	274	0	0,00
1924 . . . . .	764	135	208	421	1	0,14
1925 . . . . .	782	110	316	356	0	0,00
1926 . . . . .	634	74	246	314	0	0,00
1927 . . . . .	639	78	281	280	0	0,00
1928 . . . . .	671	76	203	387	0	0,00
1929 . . . . .	542	49	231	262	0	0,00
1930 . . . . .	589	77	116	396	0	0,00
1931 . . . . .	531	49	212	270	0	0,00
1932 . . . . .	561	64	271	226	0	0,00
1933 . . . . .	443	41	122	280	0	0,00
1934 . . . . .	496	23	51	422	0	0,00
1935 . . . . .	510	18	42	450	0	0,00
1936 . . . . .	463	13	20	430	0	0,00
1937 . . . . .	454	2	18	434	0	0,00
1938 . . . . .	411	3	11	397	0	0,00
1939 . . . . .	411	2	14	395	0	0,00
1940 . . . . .	449	0	8	441	0	0,00
Total général.	53.755	7.080	27.182	19.493	151	0,28

11° *Mesures prises en vue de poursuivre l'évolution des cas traités pendant six mois au maximum.*

Aucun accident ne nous a été signalé par les médecins et les vétérinaires chez les personnes qui ont subi le traitement.

12° *Accidents paralytiques* : Néant.

13° *Décès* : Néant.

La statistique pour 1940 est donc ainsi établie :

Personnes traitées . . . . .	449
Mort . . . . .	Néant.
Mortalité p. 100 . . . . .	0



# TABLE ANALYTIQUE

DU TOME 66

<i>Alimentation</i> . Rôle joué par le régime alimentaire et par la vitamine C dans la tuberculose expérimentale du cobaye. . . .	453
<i>Allergie</i> . Apparition précoce de l' — et de la résistance antituberculeuse chez les animaux vaccinés par le BCG au moyen de scarifications cutanées. . . . .	26
<i>Ammoniac</i> . Microbiologie du sol. Synthèse enzymatique de l' — dans le sol et les eaux. . . . .	97
<i>Anaérobies</i> . Métabolisme et évolution des bactéries cellulolytiques. — libres et parasites. . . . .	57
<i>Antigène</i> . Relations quantitatives entre l' — glucido-lipidique O et le haptène glucidique du bacille typhique et les immunosérums de lapin. . . . .	136
— Voir <i>Rickettsies</i> .	
<i>Argyrophilie</i> . Variations dans l' — des spirochètes. . . . .	83
<i>Bacilles acido-résistants</i> . Propriétés pathogènes et vaccinales de — — — de type S (lisse) isolés du sang au cours de l'infection tuberculeuse évolutive chez de jeunes sujets. . . . .	5
Etude chimique des substances grasses des — — —. . . . .	473
<i>Bacille de Grips</i> . Type respiratoire du — —. . . . .	78
<i>Bacilles paratuberculeux</i> . Propriétés toxiques et sensibilisantes. . . . .	284
<i>Bacille perfringens</i> . Etude de la toxine du — —. . . . .	204
— de Poels. Voir <i>Bacille de Grips</i> .	
<i>Bacilles tuberculeux atténués</i> . Hypersensibilité à la tuberculine et résistance aux surinfections virulentes produites par le — — — R <sub>1</sub> . . . . .	32
<i>Bacille tuberculeux bovin</i> . Modifications de la virulence du — — — au cours des réensemencements successifs sur pomme de terre billée. . . . .	191
— typhique. Voir <i>Antigène</i> .	
<i>Bactéries cellulolytiques</i> . Métabolisme et évolution des — — anaérobies libres et parasites. . . . .	57
<i>BCG</i> . Apparition précoce de l'allergie et de la résistance antituberculeuse chez les animaux vaccinés par le — au moyen de scarifications cutanées. . . . .	26

<i>Biologie de la pomme de terre.</i> . . . . .	249
<i>Bismuth</i> dans les cellules et les tissus animaux. Formation de cristaux caractéristiques. . . . .	90
<i>Carbone</i> . Nutrition carbonée de <i>M. lwoffi</i> . . . . .	417
<i>Cellules</i> . Voir <i>Bismuth</i> .	
<i>Cellulolytiques</i> . Métabolisme et évolution des bactéries — anaérobies libres et parasites. . . . .	57
<i>Chlore</i> . Dosage des chlorures sanguins. Influence des citrates sur la répartition du chlore entre les globules et le plasma. . . . .	169
<i>Chlorures</i> . Voir <i>Chlore</i> .	
<i>Citrates</i> . Influence des — sur la répartition du chlore entre les globules et le plasma. . . . .	169
<i>Cobaye</i> . Régime alimentaire et vitamine C dans la tuberculose expérimentale du —. . . . .	453
<i>Corynebacterium pyogenes</i> . Type respiratoire de l'espèce — — (var. <i>C. bovis</i> , B. de Poels, et var. <i>C. suis</i> , B. de Grips). . . . .	78
<i>Cuivre</i> . Rôle du — dans l'atténuation des venins de <i>Vipera aspis</i> et de <i>Naja tripudians</i> et d'une toxine végétale, la ricine, par le peroxyde d'hydrogène. . . . .	379
<i>Darling</i> . Histoplasmose de —. . . . .	397
<i>Eaux</i> . Synthèse enzymatique de l'ammoniac dans le sol et les —. . . . .	97
<i>Epidémiologie</i> . Voir <i>Fièvre jaune</i> .	
<i>Euglena anabaenia</i> . Culture et pouvoir de synthèse d' — —, var. <i>minor</i> Mainx. . . . .	159
<i>Fièvre jaune</i> . Recherche du test de protection de la souris et examen histologique du foie envisagés comme indicateurs dans l'épidémiologie de la — —. . . . .	320
<i>Flagellé</i> . Voir <i>Polytomella caeca</i> .	
<i>Foie</i> . Voir <i>Fièvre jaune</i> .	
<i>Haptène glucidique</i> . Voir <i>Antigène</i> .	
<i>Histoplasmose</i> de Darling. . . . .	397
<i>Hypersensibilité</i> à la tuberculine conférée par le bacille atténué $R_1$ . . . . .	32
<i>Immunité</i> conférée par le bacille tuberculeux $R_1$ . . . . .	32
— conférée par le pneumocoque III. . . . .	129
<i>Immunsérums</i> . Voir <i>Antigène</i> .	
<i>Ions H et OH</i> . Limites de concentration en — — compatibles avec le développement <i>in vitro</i> du flagellé <i>Polytomella caeca</i> . . . . .	407
<i>Lapins</i> . Causes modificatrices de l'évolution de la rage chez les — inoculés avec le virus fixe. . . . .	187
— inoculé par voie respiratoire avec les Rickettsies du typhus historique . . . . .	425
— Relations quantitatives entre l'antigène glucido-lipidique O et le haptène glucidique du bacille typhique et les immunsérums de —. . . . .	136
— Tuberculose du —. Voir <i>Urée</i> .	

<i>Microbiologie</i> du sol. Synthèse enzymatique de l'ammoniac dans le sol et les eaux. . . . .	97
<i>Naja tripudians</i> . Rôle du cuivre dans l'atténuation du venin de — par le peroxyde d'hydrogène. . . . .	379
<i>Nutrition</i> carbonée de <i>M. lwoffi</i> . . . . .	417
<i>Parasites</i> . Voir <i>Bactéries cellulolytiques</i> .	
<i>Paratuberculeux</i> . Voir <i>Bacilles</i> — . . . . .	284
<i>Peroxyde d'hydrogène</i> . Voir <i>Cuivre</i> .	
<i>Pneumocoque III</i> . Sur l'immunité conférée par le — . . . . .	129
<i>Polytomella caeca</i> . Développement du — . . . . .	407
<i>Pomme de terre</i> . Biologie de la — — . . . . .	249
<i>Rage</i> . Observations sur les causes modificatrices de l'évolution de la — chez les lapins inoculés avec le virus fixe. . . . .	187
— Vaccinations antirabiques à l'Institut Pasteur en 1940. . . . .	483
<i>Régime alimentaire</i> . Voir <i>Alimentation</i> .	
<i>Ricine</i> . Rôle du cuivre dans l'atténuation de la —, par le peroxyde d'hydrogène. . . . .	379
<i>Rickettsies</i> . Lapin inoculé par voie respiratoire avec les — du typhus historique. Pouvoir antigène des suspensions. . . . .	425
<i>Sang</i> . Dosage des chlorures sanguins. Influence des citrates sur la répartition du chlore entre les globules et le plasma. . . . .	169
— Dosages d'urée dans le — de lapins au cours de la tuberculose expérimentale. . . . .	438
— Voir <i>Bacilles acido-résistants</i> .	
<i>Scarifications cutanées</i> . Voir <i>BCG</i> .	
<i>Sérum anti-histolytique</i> . Titre antitoxique. . . . .	204 et 329
— <i>anti-œdématis</i> . Titre antitoxique. . . . .	204 et 329
— <i>anti-perfringens A</i> . Titre antitoxique. . . . .	204 et 329
— <i>anti-vibron septique</i> . Titre antitoxique. . . . .	204 et 329
<i>Sol</i> . Microbiologie du —. Synthèse enzymatique de l'ammoniac dans le — et les eaux. . . . .	97
<i>Souris</i> . Test de protection de la — et examen histologique du foie envisagés comme indicateurs dans l'épidémiologie de la fièvre jaune. . . . .	320
<i>Spirochètes</i> . Variations dans l'argyrophilie des — . . . . .	83
<i>Toxines</i> . Détermination du titre antitoxique des sérums anti- <i>perfringens A</i> , anti-vibron septique, anti-histolytique et anti-œdématis. Préparation, titrage et propriétés des — correspondantes. . . . .	204 et 329
— Etude de la toxine du <i>Bac. perfringens A</i> . . . . .	204 et 329
<i>Toxine végétale</i> . Atténuation d'une — —, la ricine, par le peroxyde d'hydrogène. . . . .	379
<i>Toxinogénèse</i> dans différents milieux. . . . .	329
<i>Tuberculine</i> . Hypersensibilité à la — et résistance aux surinfections virulentes produites par le bacille tuberculeux atténué <i>R<sub>1</sub></i> . . . . .	32

<i>Tuberculose</i> . Apparition précoce de l'allergie et de la résistance antituberculeuse chez les animaux vaccinés par le BCG au moyen de scarifications cutanées. . . . .	26
— Propriétés pathogènes et vaccinales de bacilles acido-résistants de type S (lisse) isolés du sang au cours de l'infection tuberculeuse évolutive chez de jeunes sujets. . . . .	5
— Voir <i>Tuberculine</i> .	
— <i>expérimentale</i> . Dosages d'urée dans le sang de lapins au cours de la — —. . . . .	438
— —. Rôle joué par le régime alimentaire et par la vitamine C dans la — — du cobaye . . . . .	453
<i>Typhus historique</i> . Voir <i>Rickettsies</i> .	
<i>Urée</i> . Dosages d' — dans le sang de lapins au cours de la tuberculose expérimentale . . . . .	438
<i>Vaccination</i> . Apparition précoce de l'allergie et de la résistance antituberculeuse chez les animaux vaccinés par le BCG au moyen de scarifications cutanées. . . . .	26
<i>Vaccination</i> . Propriétés pathogènes et vaccinales de bacilles acido-résistants de type S (lisse) isolés du sang au cours de l'infection tuberculeuse évolutive chez de jeunes sujets. . . . .	5
<i>Vaccinations antirabiques</i> à l'Institut Pasteur en 1940. . . . .	483
<i>Venins</i> . Voir <i>Naja tripudians</i> et <i>Vipera aspis</i> .	
<i>Vipera aspis</i> . Rôle du cuivre dans l'atténuation du venin de — — par le peroxyde d'hydrogène. . . . .	379
<i>Virulence</i> . Modifications de la — du bacille tuberculeux bovin au cours des réensemencements successifs sur pomme de terre biliée. . . . .	191
<i>Virus fixe</i> . Voir <i>Rage</i> .	
<i>Vitamine C</i> . Voir <i>Alimentation</i> .	

# TABLE ALPHABÉTIQUE PAR NOMS D'AUTEURS

DU TOME 66

## Notices nécrologiques.

† LESTOQUARD (F.), par J. BRIDRÉ. . . . .	405
† REGAUD (Cl.), par A. LACASSAGNE. . . . .	181

ARMAND-DELILLE (P.-F.) et GYSIN (M <sup>lle</sup> O.). — Etude des propriétés pathogènes et vaccinales de bacilles acido-résistants de type S (lisse) isolés du sang au cours de l'infection tuberculeuse évolutive chez de jeunes sujets. . . . .	5
AUDUREAU (A.). — Voir LWOFF (A.)	
BABLET (J.). — La recherche du test de protection de la souris et l'examen histologique du foie envisagés comme indicateurs dans l'épidémiologie de la fièvre jaune. . . . .	320
— Note sur l'histoplasmosse de Darling. . . . .	397
BOQUET (Alfred). — L'hypersensibilité à la tuberculine et la résistance aux surinfections virulentes produites par le bacille tuberculeux atténué R <sub>1</sub> . . . . .	32
BOQUET (Paul). — Rôle du cuivre en quantités infinitésimales dans l'atténuation des venins de <i>Vipera aspis</i> et de <i>Naja tripudians</i> et d'une toxine végétale, la ricine, par le peroxyde d'hydrogène. . . . .	379
— Voir COTONI (L.).	
BRETEY (J.). — Remarques sur le rôle joué par le régime alimentaire et par la vitamine C dans la tuberculose expérimentale du cobaye. . . . .	453
— Voir NÈGRE (L.).	
BRIDRÉ (J.). — Notice nécrologique sur F. LESTOQUARD. . . . .	405
CHORINE (V.). — Dosage des chlorures sanguins. Influence des citrates sur la répartition du chlore entre les globules et le plasma. . . . .	169
COTONI (L.) et BOQUET (P.). — Recherches sur l'immunité conférée par le pneumocoque III. . . . .	129
CRUVEILHIER (L.) et VIALA (Ch.). — Les vaccinations antirabiques à l'Institut Pasteur en 1940. . . . .	483



- DEINSE (F. van). — Modifications de la virulence du bacille tuberculeux bovin au cours des réensemencements successifs sur pomme de terre biliée. . . . . 191
- et SOLOMIDÈS (J.). — Dosages d'urée dans le sang de lapins au cours de la tuberculose expérimentale. . . . . 438
- DURAND (Paul). — Voir GIROUD (Paul).
- DUSI (Hisatake). — La culture et le pouvoir de synthèse d'*Euglena anabaenia*, var. *minor* Mainx. . . . . 159
- GIROUD (Paul) et DURAND (Paul). — Le lapin inoculé par voie respiratoire avec les Rickettsies du typhus historique. Pouvoir antigène des suspensions. . . . . 425
- GRABAR (Pierre). — Voir HORNUS (Georges).
- GRYSEZ (Victor). — Observations sur les causes modificatrices de l'évolution de la rage chez les lapins inoculés avec le virus fixe. . . . . 187
- GUILLAUMIE (Maylis). — Détermination du titre antitoxique des sérums anti-*perfringens* A, anti-vibrion septique, antihistolytique et anti *œdematiens*. Préparation, titrage et propriétés des toxines correspondantes (premier mémoire). Contribution à l'étude de la toxine du *Bac. perfringens* A. . . . . 204
- (deuxième mémoire). Toxinogénèse des différents milieux. . 329
- GY SIN (M<sup>lle</sup> O.). — Voir ARMAND-DELILLE (P.-F.).
- HORNUS (Georges J.-P.) † et GRABAR (Pierre). — Relations quantitatives entre l'antigène glucido-lipidique O et le haptène, glucidique du bacille typhique et les immunsérums de lapin. . . . . 136
- LACASSAGNE (A.). — Notice nécrologique sur Cl. REGAUD. . . . 181
- LAPORTE (R.). — Contribution à l'étude des bacilles paratuberculeux. III. Propriétés toxiques et sensibilisantes. . . . . 284
- LWOFF (André). — Limites de concentration en ions H et OH compatibles avec le développement *in vitro* du flagellé *Polytomella caeca*. . . . . 407
- et AUDUREAU (A.). — Nutrition carbonée de *M. lwoffii*. . . . 417
- MACROU (J.). — Remarques sur la biologie de la pomme de terre. 249
- MANOUELIAN. — Variations dans l'argyrophilie des spirochètes. . 83
- NÈGRE (L.) et BRETEY (J.). — Sur l'apparition précoce de l'allergie et de la résistance antituberculeuse chez les animaux vaccinés par le BCG au moyen de scarifications cutanées. . . 26
- POCHON (J.). — Métabolisme et évolution des bactéries cellulolytiques anaérobies libres et parasites. . . . . 57
- POUZERGUES (J.). — Voir SAZERAC (R.).
- PRUDHOMME (R.-O.). — Contribution à l'étude de quelques composés gras des bacilles acido-résistants. . . . . 473
- SAZERAC (R.) et POUZERGUES (J.). — Recherche du bismuth dans les cellules et les tissus animaux. Formation de cristaux caractéristiques. . . . . 90

SENTHILLE (F.). — Recherches sur le type respiratoire de l'espèce <i>Corynebacterium pyogenes</i> (var. <i>C. bovis</i> , B. de Poels, et var. <i>C. suis</i> , B. de Grips). . . . .	78
SOLOMIDÈS (J.). — Voir DEINSE (F. van).	
VIALA (Ch.). — Voir CRUVEILHIER (L.).	
WINOGRADSKY (S.). — Etudes sur la microbiologie du sol (deuxième mémoire). Sur la synthèse enzymatique de l'ammoniac dans le sol et les eaux. . . . .	97

---

Le Gérant : G. MASSON.

---

Imprimé par l'Ancien Imple de la Cour d'Appel, A. MARETHEUX, Dir.,  
1, r. Cassette, à Paris (France).

